

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Zuzana Kalaninová

Příprava afinitních povrchů pro hmotnostní spektrometrii

Preparation of affinity surfaces for mass spectrometry

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Petr Pompach, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Abstrakt

Jednou z nejvíce účinných toxických substancí biologického původu známých lidstvu jsou botulotoxiny, nervové jedy produkované bakteriemi rodu *Clostridium*. Místem jejich účinku jsou nervosvalová zapojení, ve kterých štěpí proteiny SNARE komplexu, čímž zamezí uvolnění neurotransmiteru a přenosu nervového vzruchu. Výsledkem je ochablá paralýza, hlavní symptom onemocnění zvaného botulismus. Kvůli nízké smrtelné dávce a vysoké toxicitě mají BoNTs své místo na seznamu činitelů bioterorismu. I když je dnes k dispozici mnoho metod jejich detekce, „zlatým standardem“ jsou dosud biologické testy na myších. Nehledě na etickou stránku těchto experimentů, značnou nevýhodou je i jejich časová náročnost.

V této práci je představeno unikátní spojení proteinových povrchů s metodou využívající k detekci aktivních BoNTs jejich endopeptidasovou aktivitu a hmotnostní spektrometrii, EndoPep-MS. Funkcionalizované povrchy byly připraveny metodou měkkého přistávání iontů za atmosférického tlaku, která využívá proud hypertermálních iontů (rozsah energie 1–100 eV), čímž umožňuje kontrolovanou modifikaci. Botulotoxin A1 byl detekován dvěma způsoby. První byl založen na interakci avidin-biotin, kdy byly na neutravidinem modifikovaném povrchu nabohaceny biotinem značené peptidy (substrátový peptid pro BoNT/A i peptidové produkty jeho aktivity). V druhém případě byl před reakcí se substrátovým peptidem toxin izolován ze vzorku pomocí povrchu s imobilizovanou protilátkou. K analýze peptidů navázaných na povrchu byla využita hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí/ionizací za účasti matrice a analyzátozem doby letu (MALDI-TOF-MS). Tato metoda se ukázala být úspěšnou nejen při stanovení toxinu v pufru, ale i v komplexní matrici, kterou bylo suché granulované krmivo pro psy.

Klíčová slova: botulotoxin A1, BoNT/A1, EndoPep-MS, metoda měkkého přistávání iontů, AISL, MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Abstract

One of the most potent toxic substances of biological origin known are botulinum toxins – nerve toxins produced by strains of *Clostridium* bacteria. They affect neuro-muscular connections where they cleave proteins of the SNARE complex, block neurotransmitter release, and thus stop signal transmission. This leads to flaccid paralysis, the main symptom of a disease called botulism. Due to their extremely low lethal dose and high toxicity, BoNTs take a place on the list of agents of bioterrorism. Despite numerous methods available to this date, the mouse bioassay remains the gold standard for the detection of BoNTs. Regardless of the ethical aspects of these experiments, the time they require is also inconvenient.

In this work, a unique combination of protein surfaces and detection of active BoNTs through their endopeptidase activity and mass spectrometry, EndoPep-MS, is introduced. Functionalized surfaces were prepared by ambient ion soft landing – a technique utilizing a beam of hyperthermal ions (energy range 1–100 eV) as a tool for controlled modification. Two approaches to the detection of botulinum toxin A1 were applied. One of them, based on avidin-biotin interaction, used a neutravidin-modified surface for enhancement of biotinylated peptides (substrate peptide for BoNT/A and peptide products of its activity). In the latter case, the toxin was isolated from samples prior to reaction with substrate peptide, using an antibody-immobilized surface. Determination of surface-bound peptides was performed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). This method appeared to be successful both in the detection of active toxin in samples with the toxin in buffer and the toxin in complex matrices, such as dry granular dog food.

Key words: botulinum toxin A1, BoNT/A1, EndoPep-MS, ambient ion soft landing, AISL, MALDI-TOF mass spectrometry

[In Czech]

Poděkování

Na prvom mieste by som chcela poďakovať svojmu školiťovi, RNDr. Petrovi Pompachovi, Ph.D. za vedenie, odbornú pomoc a cenné rady nielen pri písaní tejto práce, ale aj počas celého výskumu.

Taktiež ďakujem mjr. PharmDr. Jiřímu Dreslerovi, Ph.D. z Ústřední vojenské nemocnice v Praze za sprostredkovanie doručenia toxínu a protilátok využitých v rámci tejto práce.

Osobitá vďaka patrí celému kolektívu Laboratoře strukturní biologie a buněčné signalizace (Mikrobiologický ústav, AV ČR) za vytvorenie atmosféry, vďaka ktorej bolo ranné vstávanie do práce jednoduchšie a čas strávený v nej plný unikátnych okamihov.

V neposlednom rade chcem slová vďačnosti vyjadriť celej mojej rodine a priateľom za všetko, čo pre mňa robili a čím mi boli počas celého môjho štúdia.

Obsah

1	Teoretický úvod	11
1.1	Funkcionalizace povrchů metodou měkkého přistávání iontů	11
1.1.1	Realizace ISL ve vakuu	13
1.1.2	Realizace ISL za atmosférického tlaku	14
1.1.3	Aplikace ISL v praxi: Modifikace povrchů biomolekulami	17
1.2	MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie	18
1.3	Botulotoxiny	20
1.3.1	Struktura BoNTs a jejich působení na organismus	21
1.3.1.1	Využití účinku BoNTs v medicíně	25
1.3.2	Detekce BoNTs	26
1.3.2.1	Biologické testy na myších	26
1.3.2.2	ELISA	27
1.3.2.3	EndoPep-MS	28
1.3.2.4	Ostatní metody detekce BoNTs	29
2	Cíle	32
3	Experimentální část	33
3.1	Seznam použitého materiálu a přístrojů	33
3.1.1	Přístroje a pomůcky	33
3.1.2	Programy	33
3.1.3	Chemikálie	34
3.1.3.1	Peptidový standard pro BoNT/A	34
3.1.3.2	Protilátky proti BoNT/A1	35
3.1.3.3	Pufry a roztoky	35
3.2	Experimentální metody	35
3.2.1	Funkcionalizace povrchů	35
3.2.1	Příprava reakčních směsí s toxinem BoNT/A1	37
3.2.2	Příprava reakčních směsí s toxinem BoNT/A1 v komplexní matrici	38
3.2.2.1	Experiment N° 1	38
3.2.2.2	Experiment N° 2	39
3.2.2.3	Experiment N° 3	39
3.2.2.4	Experiment N° 4	39
3.2.2.5	Experiment N° 5	39
3.2.1	EndoPep-MS ve spojení s afinitními nosiči	40
3.2.1.1	Neutravidinové povrchy	40

3.2.1.1.1	Validace	42
3.2.1.2	Imunoafinitní povrchy s anti-BoNT/A1 protilátkou.....	42
3.2.1	MALDI-TOF-MS.....	43
4	Výsledky	45
4.1	Detekce BoNT/A1 pomocí afinitních nosičů modifikovaných neutravidinem	45
4.1.1	Validace	46
4.1	Detekce BoNT/A1 pomocí povrchů modifikovaných protilátkou.....	49
5	Diskuse	56
6	Závěr	61

Seznam zkratk a symbolů

Pep	substrátový peptid pro BoNT/A biotinylovaný na C- i N-konci
AISL	měkké přistávání iontů za atmosférického tlaku (z angl. <i>ambient ion soft landing</i>)
BoNT/X	botulotoxin typu X (X = A–G)
BoNTs	botulotoxiny
CDC	Centra pro kontrolu a prevenci nemocí (z angl. <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
CID	kolizi indukovaná disociace (z angl. <i>collision-induced dissociation</i>)
CT	C-terminální peptid vznikající ze substrátového peptidu Pep působením BoNT/A
CT*	C-terminální peptid vznikající ze substrátového peptidu *Pep* působením BoNT/A
(k)Da	(kilo)Dalton, jednotka molekulové hmotnosti
DHAP	2,5-dihydroxybenzoová kyselina
ELISA	imunochemická metoda (z angl. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EndoPep-MS	metoda stanovení BoNTs založená na jejich endopeptidasové aktivitě a hmotnostně spektrometrické analýze (z angl. <i>Endopeptidase mass spectrometry</i>)
ESCA	elektronová spektroskopie pro chemickou analýzu (z angl. <i>Electron Spectroscopy for Chemical Analysis</i>)
(nano)ESI	ionizace (nano)elektrosprejem (z angl. <i>electrospray ionisation</i>)
ESSI	ionizace elektrosonikačním sprejem (z angl. <i>electrosonic spray ionisation</i>)
(k)eV	(kilo)elektronvolt, jednotka energie
FAB	ionizace ostřelováním urychlenými atomy (z angl. <i>fast atom bombardment</i>)
FRET	metoda založená na fluorescenčním rezonančním přenosu energie (z angl. <i>Fluorescence resonance energy transfer</i>)
FT-ICR	analyzátor s iontovou cyklotronovou rezonancí a Fourierovou transformací (z angl. <i>Fourier transform-ion cyclotron resonance</i>)
HA	z angl. <i>hemagglutinin</i>

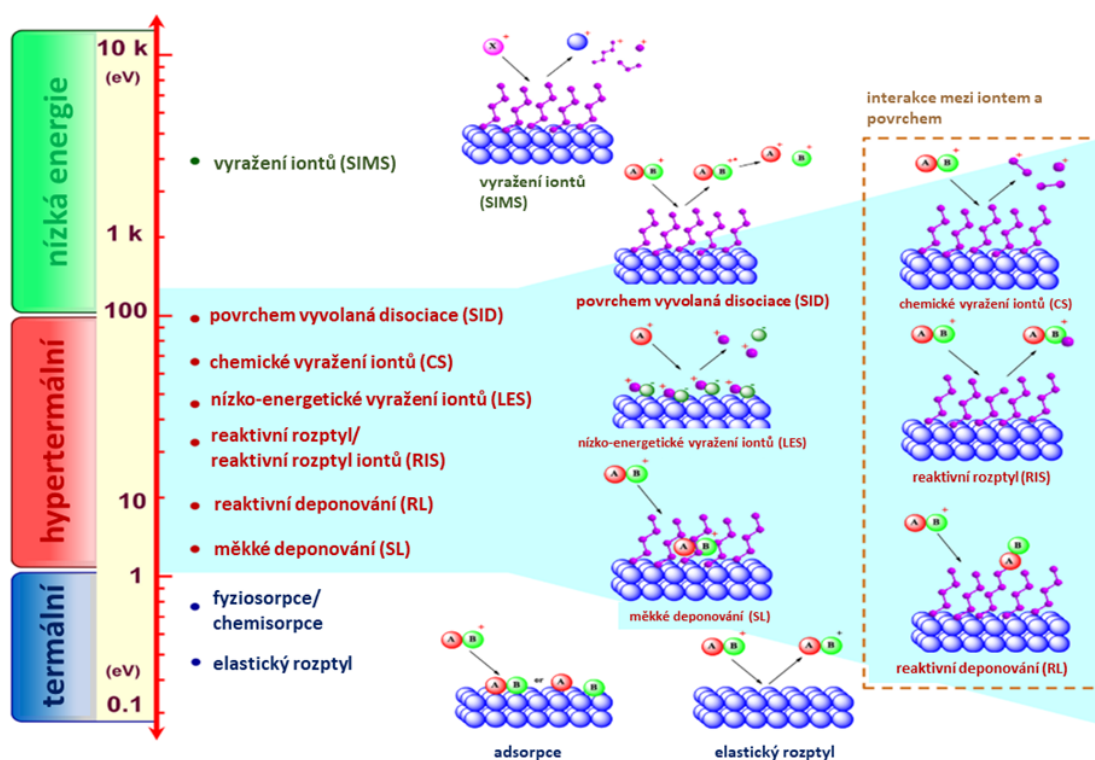
H _C	těžký řetězec BoNTs (z angl. <i>heavy chain</i>), vazebná doména
HCCA	kyselina α-kyano-4-hydroxyskořicová
H _N	těžký řetězec BoNTs (z angl. <i>heavy chain</i>), translokační doména
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
ISL	měkké přistávání iontů (z angl. <i>ion soft landing</i>)
ITO	oxid india a cínu (z angl. <i>indium tin oxide</i>)
L-TCs	velké multiproteinové komplexy BoNTs s NAPs
LC	lehký řetězec BoNTs (z angl. <i>light chain</i>), katalytická doména
LD ₅₀	smrtelná dávka, která způsobí úhyn poloviny sledované populace (z angl. <i>median lethal dose</i>)
LFAs	imunochemické metody založené na laterálním toku vzorku (z angl. <i>lateral flow assays</i>)
<i>m/z</i>	poměr hmoty k náboji (z angl. <i>mass-to-charge ratio</i>)
M-TC	komplex BoNTs s NTNHA
MAG	magnetický sektor
MALDI	desorpce/ionizace laserem za účasti matrice (z angl. <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
MBA	biologické testy na myších (z angl. <i>mouse bioassay</i>)
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. <i>mass spectrometry</i>)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NAPs	netoxické, s BoNTs asociované proteiny (z angl. <i>nontoxic neurotoxin-associated proteins</i>)
NT	N-terminální peptid vznikající ze substrátového peptidu Pep působením BoNT/A
NT*	C-terminální peptid vznikající ze substrátového peptidu *Pep* působením BoNT/A
NTNHA	z angl. <i>nontoxic nonhemagglutinin</i>
(q)PCR	(kvantitativní) polymerasová řetězová reakce (z angl. <i>(quantitative) polymerase chain reaction</i>)
PDI	ionizace a desorpce plazmou (z angl. <i>plasma desorption/ionization</i>)
RL	reaktivní přistávání iontů (z angl. <i>reactive landing</i>)

q	kvadrupólový hmotnostní analyzátor
S/N	poměr signálu k šumu (z angl. <i>signal-to-noise ratio</i>)
(F-)SAMs	(fluorované) samo-skládající se monovrstvy organických molekul (z angl. <i>self-assembled monolayers</i>)
SID	povrchem vyvolaná disociace (z angl. <i>surface-induced dissociation</i>)
SIMS	hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů (z angl. <i>secondary ion mass spectrometry</i>)
SNARE	komplex důležitý pro přenos nervového vzruchu (z angl. <i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>)
TOF	analyzátor doby letu (z angl. <i>time of flight</i>)

1 Teoretický úvod

1.1 Funkcionalizace povrchů metodou měkkého přistávání iontů

Kolize mezi proudem iontů a určitým povrchem vedou k několika typům procesů [1],[2],[3]. Tyto ionty jsou v závislosti na jejich narůstající energii rozděleny do tří skupin – termální, hypertermální a nízkoenergetické. Jednotlivé procesy, ke kterým při kolizích dochází, jsou znázorněny na obrázku 1. V experimentech popsanych v příslušné literatuře byly ke zkoumání těchto interakcí využity samo-skládající se monovrstvy organických molekul (SAMs; z angl. *self-assembled monolayers*) [4],[5],[6], kovové [7],[8] a grafitové povrchy [9], různé polymery [10] či netěkavé kapaliny [11].



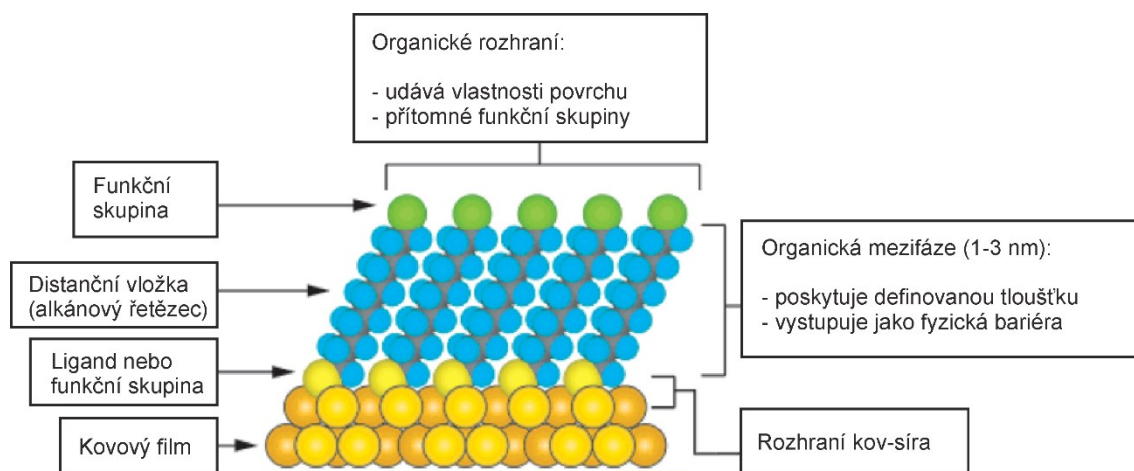
Obr. 1. Procesy pozorované při kolizi proudu iontů v určitém energetickém rozmezí a příslušného povrchu. Převzato a upraveno z [3].

Jedním z pozorovaných dějů je vyražení iontů (z angl. *sputtering*). Při něm srážkou primárních iontů o nízké energii (≤ 10 keV) dochází k vyražení nabitých atomů a molekul z pevného povrchu. Vzniklé částice jsou následně analyzovány hmotnostním spektrometrem a příslušná metoda, umožňující charakterizaci povrchů na základě tohoto

jevu, se nazývá hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů (SIMS; z angl. *secondary ion mass spectrometry*) [12],[13],[14]. Koncem minulého století se kvůli své vyšší citlivosti a specifitě stala mocnějším nástrojem než elektronová spektroskopie.

V hypertermální oblasti, s energií iontů pohybující v rozmezí 1–100 eV, je kolizní energie srovnatelná nebo větší než energie chemických vazeb. Při reaktivních kolizích tak mohou, jak zanikat staré, tak vznikat vazby nové a z chemického pohledu se jedná o nejzajímavější oblast. Z procesů, ke kterým zde dochází, jsou zde zmíněny povrchem vyvolaná disociace, chemické vyražení iontů a reaktivní a měkké deponování. To, který jev převládne, závisí na kolizní energii i vlastnostech obou kolizních partnerů. Povrchem vyvolaná disociace (SID; z angl. *surface-induced dissociation*) [15],[16] je fragmentační technikou, komplementární s kolizí indukovanou disociací (CID). Ta nachází své uplatnění v tandemové hmotnostní spektrometrii a na rozdíl od SID, při CID fragmentace nastává srážkou analytu s molekulami inertního plynu. SID skýtá možnost získání informací o chemické podstatě molekulových povrchů i jejich modifikování vytvořením kovalentní vazby mezi primárním iontem a funkčními skupinami povrchu. Chemické vyražení iontů (z angl. *chemical sputtering*) [3],[15],[17] charakterizuje uvolnění částic, jejich desorpci, z povrchu ve formě iontů, v důsledku přenosu náboje z dopadajících iontů na látku adsorbovanou na příslušný povrch. Hmotnostní spektrum těchto desorbovaných částic nese informaci o vnější vrstvě povrchu.

Usměrněním proudu iontů v plynném stavu, disponujících kinetickou energií v řádech eV, proti určitému povrchu, lze docílit reaktivního nebo měkkého deponování. Pokud nastává kovalentní imobilizace, jedná se o reaktivní přistávání iontů (RL; z angl. *reactive landing*) [3]. Samotný proud iontů vystupuje jako reaktant a výsledkem je vznik nové vazby s funkční skupinou na povrchu nebo uvolnění atomů či molekul z něj. Byly provedeny studie zkoumající toto uvolnění ze samo-skládajících se monovrstev organických molekul (SAMs) [18]. SAMs tvoří organické molekuly kovalentně vázané na zlatý film na kovovém či jiném podkladu (viz Obr. 2). Obvykle jsou využívány uhlovodíky nebo jejich deriváty, které se na zlato vážou přes atom síry. Kromě zlata byly studovány i jiné kovy, zejména stříbro, paládium, měď, platina a rtuť [19].

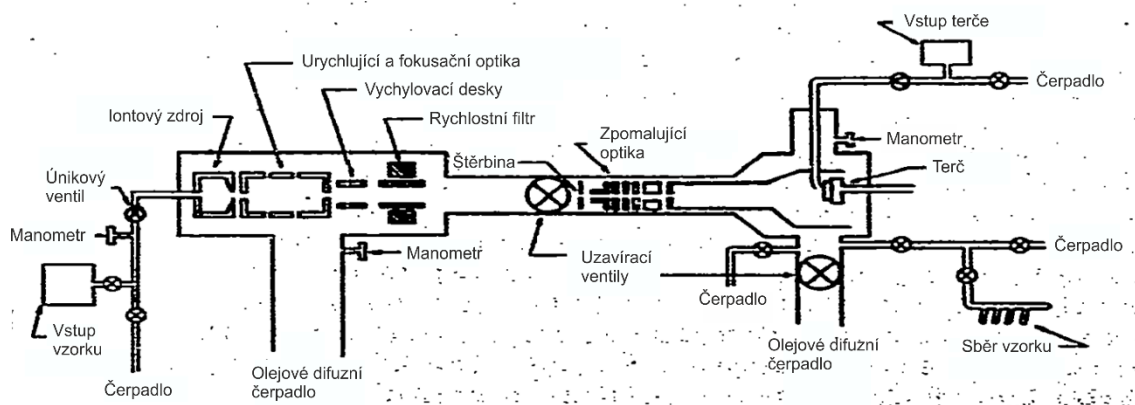


Obr. 2. Schématické znázornění SAMs. Převzato a upraveno z [19].

Při měkkém přistávání iontů (ISL; z angl. *ion soft landing*) dochází k depozici intaktních iontů na příslušný povrch. Jedná se o nedestruktivní proces, při kterém nedochází k fragmentaci molekul. Po depozici se ionty mohou vyskytovat v několika stavech [20],[21] – jsou zachyceny v nabitěm stavu nebo dochází k jejich neutralizaci a na povrchu nacházíme příslušnou neutrální molekulu. Protože prostřednictvím ISL byly připraveny všechny afinitní nosiče využité v této práci, jsou této metodě věnovány následující kapitoly.

1.1.1 Realizace ISL ve vakuu

Metodu popsal v roce 1977 kolektiv Roberta Grahama Cookse [22], který uvedl nový způsob modifikace pevných kovových povrchů proudem nízkoenergetických iontů (10 eV) jako reaktantem. Konkrétně byly využity mono-, di- a triatomické ionty obsahující síru – elementární, sulfidickou či organickou a síru v pozitivních oxidačních stavech. Ionty o požadované hmotnosti byly selektovány změnou napětí vkládaného na rychlostní (Wienův) filtr a deponovány na olověný terč, na kterém byla následně prostřednictvím elektronové spektroskopie pro chemickou analýzu (ESCA), umožňující identifikovat elementární složení zkoumaného materiálu, zjištěna přítomnost komponent obsahujících síru. Volba polyatomických iontů o nízké kinetické energii je odůvodněna skutečností, že vysokoenergetické ionty v průběhu experimentu fragmentují a s povrchem tak neinteragují ionty, ale příslušné vznikající atomy. Schéma zařízení použitého pro depozici iontů ve vakuu je zobrazena na obrázku 3.

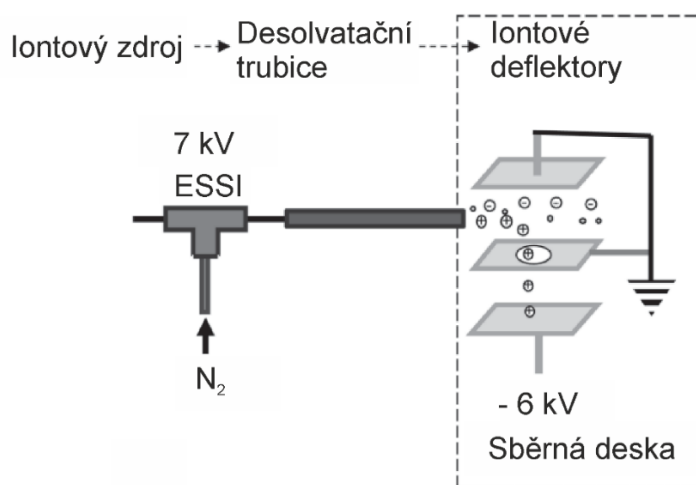


Obr. 3. Schéma aparatury umožňující měkké přistávání iontů ve vakuu. Jednotlivé části zařízení jsou popsány v obrázku. Převzato a upraveno z [22].

Z čistých kovových povrchů byl zájem přesunut na SAMs s monovrstvou fluorouhlíku (F-SAMs) [20]. Bylo zjištěno, že fluorované SAMs jsou schopny deponované ionty zadržet až po dobu několika dní, s vyšší účinností u iontů s objemnými substituenty, které napomáhají sterickému zachycení v F-SAMs.

1.1.2 Realizace ISL za atmosférického tlaku

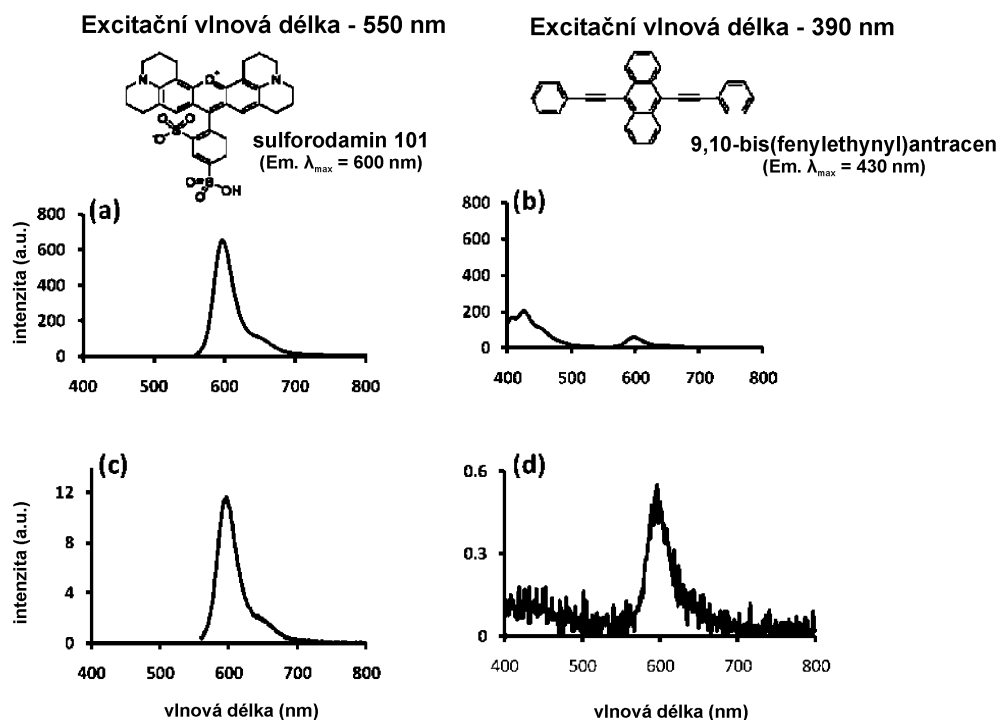
Jinou možnost uspořádání, ve kterém jsou polyatomické ionty deponovány na příslušný povrch za atmosférického tlaku, představil v roce 2011 opět tým Cooksovy laboratoře [1]. Ionty generované elektrosprejem (ESI) nebo elektrosonikačním sprejem (ESSI) byly pneumaticky vedeny vyhřívanou trubicí, kde byly zbaveny solvatačního obalu a suché byly deponovány na cílový povrch určený k modifikaci. Schéma tohoto zařízení je zachyceno na Obr. 4.



Obr. 4. Schéma prvního zařízení umožňujícího depozici iontů za atmosférického tlaku. V obrázku jsou popsány jeho jednotlivé části. Převzato a upraveno z [1].

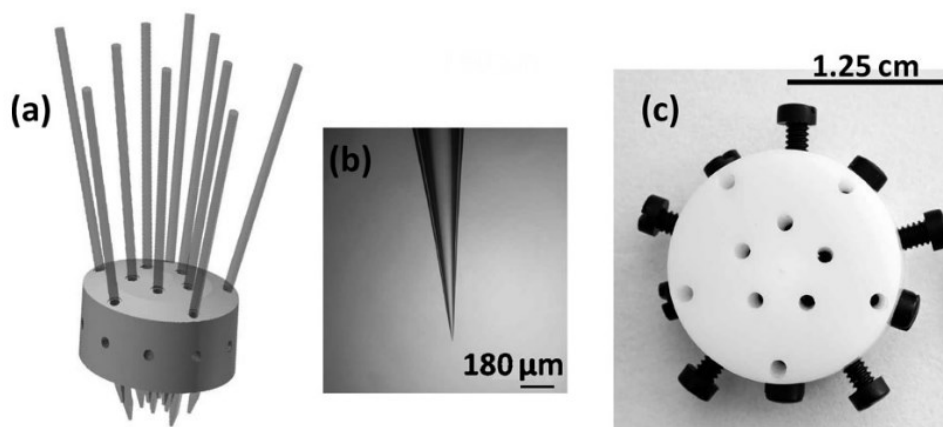
Jelikož byly k depozici využívány látky převážně poskytující jeden druh iontů, nebyla zde potřeba zapojení hmotnostního spektrometru, který by selektoval ionty na základě jejich m/z [1],[2]. Výhodou použité aparatury byla schopnost oddělení částic nabitých od neutrálních prostřednictvím deflektorových elektrod a volba polaritý sbíraných iontů vhodným nastavením polaritý vkládaného napětí. Nerezová desolvatační trubice byla vyhřívána na požadovanou teplotu a v rámci tohoto experimentu [1] byly testovány dva typy: rovná a jedenkrát svinutá. Rozdíl při použití svinuté trubice spočíval v dosažení vyššího stupně desolvatace, a tudíž v depozici čistých suchých iontů spíše než mikrokapiček; zvýšením počtu svinutí též možno dosáhnout fragmentaci [23]. Prostřední elektroda sloužila k definici tvaru a velikosti modifikované pozice na povrchu.

Deponovaný materiál byl charakterizován rozpuštěním (opláchnutí modifikovaných pozic 50% roztokem methanolu ve vodě nebo čistým methanolem) a následnou nanoESI hmotnostní spektrometrií nebo spektrofluorimetrií; fluorescenční mikroskopii byl zkoumán přímo film na povrchu. S využitím prvních dvou analýz potvrdili účinnost deflektorových elektrod; zkoumaným vzorkem byla směs nepolárního 9,10-bis(fenylethynyl)antracenu a polárního sulforodaminu 101. V emisním spektru na obrázku 5 byla pozorována přítomnost sulforodaminu 101 při excitační vlnové délce 550 nm (5c), naopak absence nepolární složky při excitační vlnové délce 390 nm; v části 5d je pozorovaný signál výsledkem interference sulforodaminu 101, který v této oblasti částečně absorbuje světlo. Stejných výsledků bylo dosaženo i analýzou původní směsi (5ab).



Obr. 5. Emisní spektra směsi obsahující dvě fluorescenční složky: sulforodamin 101 a 9,10-bis(fenylethynyl)antracen. Části **a, b** odpovídají původní směsi obsahující obě složky, části **c, d** směsi po ISL kationtů sulforodaminu 101. Spektra nalevo a napravo se liší použitou excitační energií. Převzato a upraveno z [1].

Stejná výzkumná skupina navrhla vícenásobný nanosprej pro dosažení většího proudu iontů [24]. Tento emitör se skládal z deseti skleněných kapilár s průměrem zakončení 10 μm , umístěných v teflonovém držáku (viz Obr. 6). Jeho použití demonstrovali na experimentech zesíťování peptidů, kdy buď bylo na peptidový povrch sprejováno příslušné činidlo, nebo byla situace obrácená a na povrch s činidlem byly sprejovány peptidy.



Obr. 6. Vícenásobný nanosprej pro generaci iontů při ISL za atmosférického tlaku – schéma (**a**), detail zakončení skleněné kapiláry (**b**) a ukázka reálného provedení (**c**). Převzato z [24].

1.1.3 Aplikace ISL v praxi: Modifikace povrchů biomolekulami

Možnost výběru deponovaných iontů zapojením hmotnostního spektrometru činí ISL lákavou metodou pro modifikaci povrchů. Časté je zejména její využití při selekci požadovaných látek z komplexních vzorků [25],[26]. Jedním z historicky významných experimentů preparativní hmotnostní spektrometrie byla separace a sběr isotopů uranu ^{235}U z přírodních zdrojů v rámci nukleárního výzkumného Projektu Manhattan během druhé světové války. Tento hmotnostní spektrometr, Calutron, využíval k selekci magnetický sektor [27]. Další oblastí uplatnění ISL je vývoj inovativních katalytických materiálů, například deponování velikostně definovaných klastrů platiny pro oxidační dehydrogenaci propanu [28] nebo paládia katalyzujícího oxidaci oxidu uhličitého CO [29].

Opravdovým klíčovým momentem pro budoucnost této metody bylo zjištění, že proteiny jsou po depozici a hmotnostní selekci schopny si ponechat svou nativní strukturu a s ní i biologickou aktivitu. Jako první na to přišel Gologan se svým týmem na enzymu hexokinasa [11]. Jejimi ionty modifikovali dva typy povrchů – F-SAMs a kapalně povrchy na glycerolové bázi – přičemž pozorovali mnohem vyšší retenci aktivity jenom při druhém typu. Jejich objev v roce 2005 potvrdil Michael Volný se svými spolupracovníky [21]. Ti ve své studii prostřednictvím ISL deponovali ve vakuu proteiny trypsin a streptavidin na plazmou upravený kovový povrch. U obou molekul bylo po depozici pozorováno zachování jejich biologické aktivity; u trypsinu proteolytická, u streptavidinu afinita k biotinu. Také byla zjištěna disociace streptavidinu, vyskytujícího se v roztocích ve formě tetrameru, na monomerní jednotky vlivem ionizace elektrosprejem.

Proteinové povrchy lze připravit prostřednictvím ISL nejen ve vakuu, ale i za atmosférického tlaku. Tento způsob modifikace povrchů prezentovala na několika případech výzkumná skupina Volného. V jednom z experimentů [30] úspěšně *in situ* nabohatili fosfopeptidy na MALDI terče, které byly funkcionalizovány oxidem zirkoničitým a titaničitým metodou AISL. Fosforylace je jednou z nejdůležitějších posttranslačních a regulačních mechanismů v organismech, do kterých umožňuje nahlédnout výzkum fosfopeptidů. Jsou zde určité faktory negativně ovlivňující jejich hmotnostně spektrometrickou analýzu – malý podíl modifikovaných molekul vůči

nemodifikovaným a snížená účinnost ionizace kvůli zvýšení kyselosti přidáním fosfátové skupiny. Tyto problémy byly vyřešeny právě nabohacením fosforylovaných peptidů ze směsi po tryptickém štěpení proteinu na modifikované MALDI terče.

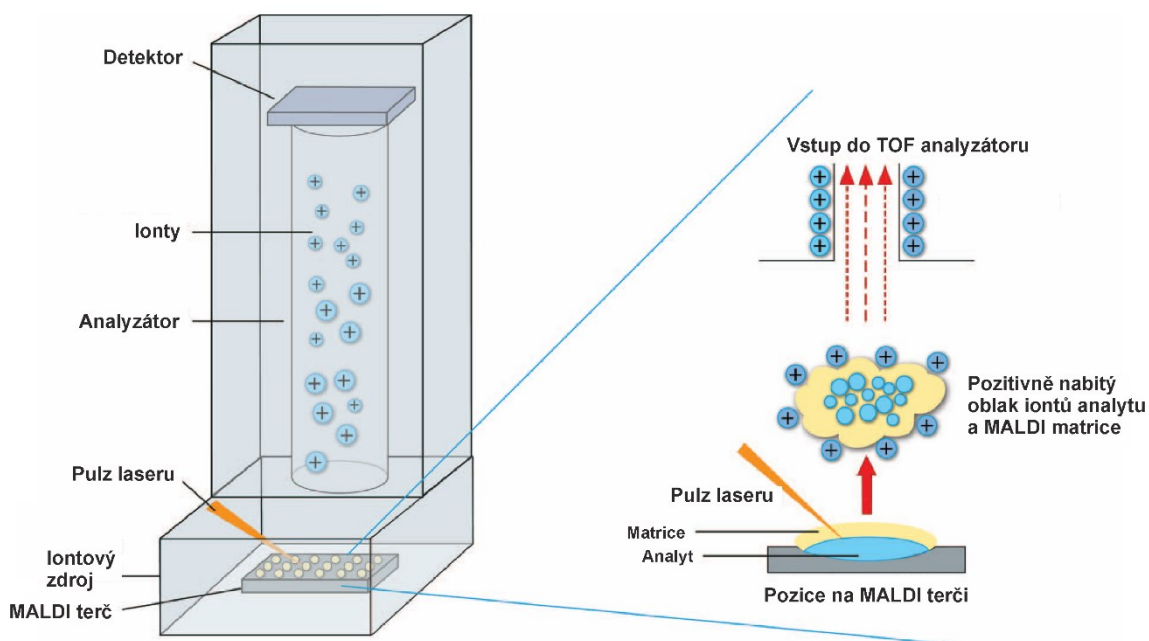
Další studie byly věnovány přípravě proteinových čipů pro klinickou diagnostiku [31],[32] a vývoj nových bioanalytických metod [33]. Na MALDI kompatibilní terče byla za atmosférického tlaku deponována protilátka proti haptoglobinu [31] – proteinu, kterého fenotyp je důležitým faktorem v predikci rizika infarktu myokardu nebo mrtvice, zvláště u pacientů trpících diabetem mellitem – a proti transferrinu [32] – důležitého přenašeče železa v organismu, kterého změny v glykosylaci jsou ukazatelem alkoholismu. Za účelem vývoje metod byly kromě imunopovrchů připraveny další typy čipů – funkcionalizované proteolytickými enzymy za účelem rychlého sekvenování peptidů a lektiny pro extrakci glykopeptidů z komplexních vzorků.

1.2 MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie představuje unikátní nástroj, umožňující analýzu rozsáhlého spektra sloučenin, malých anorganických, organických i komplexních biomolekul. Mezi její výhody patří zejména citlivost, specifita, rychlost analýzy a jednoduchost interpretace dat. Základní myšlenkou experimentu je převedení vzorku do plynné fáze ve formě nabitých částic, hmotnostní analýza na základě jejich m/z a následná detekce. Parametr m/z (z angl. *mass-to-charge ratio*) je bezrozměrnou veličinou získanou vydělením poměru hmotnosti iontu k unifikované atomové hmotnostní jednotce počtem jeho nábojů. V dnešní době je k dispozici mnoho ionizačních technik; patří k nim například ionizace a desorpce plazmatem (PDI) [34], ionizace ostřelováním urychlenými atomy (FAB) [35], ionizace elektrosprejem (ESI) [36] či desorpce/ionizace laserem za účasti matrice (MALDI) [37],[38]. Na základě dosahovaného stupně fragmentace jsou tyto techniky děleny na „měkké“ a „tvrdé“. Mezi „měkké“ jsou řazeny ESI a MALDI, iontové zdroje nejčastěji využívané pro výzkum biomolekul. Při analýze iontů se uplatňují analyzátoři jako magnetický sektor (MAG) [39], průletový analyzátor (TOF) [40], analyzátor s iontovou cyklotronovou rezonancí a Fourierovou transformací (FT-CR) [41] nebo kvadrupólový analyzátor (q) [42].

Při MALDI-TOF hmotnostní spektrometrii [37],[38],[43] je nejdříve zkoumaný vzorek smíchan s MALDI matricí a nanesen na terč, kde dochází k vzniku krystalů matrice s analytem. Pulzem laseru je matrice, která je v nadbytku, odpařena a s ní i analyt rozptýlený v ní; hlavním ionizačním mechanismem je přenos protonu. MALDI matrice jsou obvykle malé aromatické organické kyseliny, jako například 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DHAP) [44] a α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (HCCA) [45]. Vzniklé ionty jsou analyzovány na základě jejich doby letu, přičemž platí, že ionty s menší molekulovou hmotností dopadají na detektor dříve než těžší ionty.

Jelikož při lineárním TOF analyzátoru byla pozorována horší rozlišovací schopnost v důsledku velké distribuce počátečních rychlostí iontů o stejném m/z , bylo navrženo jiné uspořádání, se zapojenými iontovými zrcadly, reflektory [47]. Jedná se o optická zařízení měnící dráhu iontů tím, že dochází k zanoření iontů do těchto zrcadel v závislosti na jejich kinetické energii (čím vyšší energie iontu, tím větší je jeho zanoření). Za určitých podmínek je výsledkem postupný odraz iontů, jejich zaostření, a tím zlepšení rozlišení. Schéma lineárního MALDI-TOF hmotnostního spektrometru je na obrázku 7.



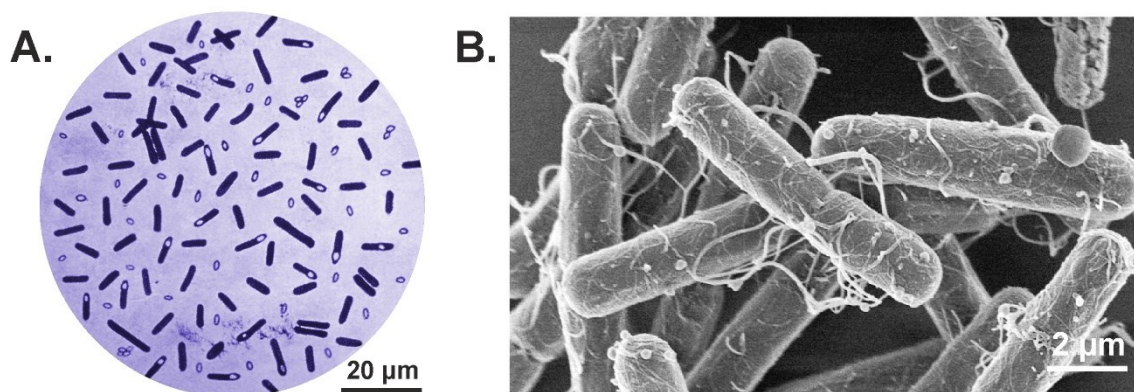
Obr. 7. Schéma MALDI-TOF hmotnostního spektrometru. V pravé části obrázku je přiblížení na jednu pozici na MALDI terči. Převzato a upraveno z [46].

1.3 Botulotoxiny

Původce onemocnění známého jako botulismus, bakterie *Clostridium botulinum*, byl objeven v roce 1895 profesorem Emilem Pierre van Ermengemem po vypuknutí epidemické choroby mezi účastníky pohřební hostiny v belgické vesnici Ellezelles [48]. Jako zdroj nákazy označil domácí šunku, jelikož všichni její poživatelé vykazovali stejné symptomy nákazy – zažívací poruchy, nevolnost, zvracení, bolesti podobné kolice, problémy se zrakem (enormní rozšíření zornic, v některých případech neschopnost reakce na světlo, ochabnutí víček) a řeči (pocit paralyzovaného jazyka), zhoršené dýchání a snížená srdeční aktivita. Svou teorii potvrdil nalezením velkého množství anaerobních mikroorganismů ve vzorku dané šunky.

Botulismus byl dlouho spjat s konzumací určitého typu klobás; označení vychází z řeckého slova pro tento masový výrobek, *botulus*. Postupně zahrnoval všechny onemocnění vzniklá požitím zkaženého masa. Srovnáním epidemie v Ellezelles a jiných, předchozích výskytů „botulismu“, symptomů nákazy a jiných faktorů, byla zavedena nová definice pro botulismus. Ta jasně stanovila, že nemoci takto označované mají specifického původce – bakteriální toxin produkovaný bakteriemi *Clostridium botulinum* [48]. Na základě způsobu vzniku infekce rozlišujeme tři formy botulismu; první z nich je intoxikace jídlem, další dvě jsou infekce způsobené *in vivo* germinací spor a následnou produkcí toxinu. Infekce jsou typické pro nemluvnata, která ještě nemají vyvinutou dostatečnou střevní mikroflóru, další cestou vstupu spor jsou pak otevřené rány, oči, nebo dýchací cesty [49],[50].

V dnešní době je *C. botulinum* vnímána jako nehomogenní druh a jednotlivé poddruhy jsou klasifikovány do čtyř tříd (označovány I–IV) lišících se mezi sebou ve fyziologických vlastnostech – růstová teplota, tepelná rezistence spor nebo tolerance solí. Kromě ní existují další producenti botulotoxinů – *C. butyricum* a *C. baratii*, v jejichž genetické informaci se také nachází *bont* gen (z angl. *botulinum neurotoxin*) [51]. Obecně patří bakterie rodu *Clostridium* mezi gram-pozitivní (G+), anaerobní bakterie tyčinkovitého tvaru (viz Obr. 8), dosahujících rozměrů 0,3–1,9 µm na šířku a 1,6–9,4 µm na délku [52]. Za určitých podmínek jsou schopny sporulace.



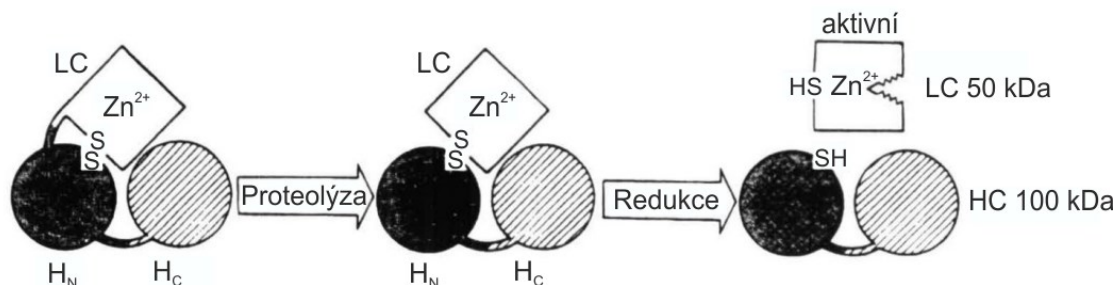
Obr. 8. Snímky zobrazující bakterie *C. botulinum* a jejich endospory pořízené pomocí světelné mikroskopie vzorku kultury obarvené krystalovou violetí (A.; převzato z Public Health Image Library, CDC) a skenovací elektronové mikroskopie. (B.; převzato z [52]).

Již začátkem 20. století začínalo být zřejmé, že existuje značná diverzita nejenom mezi BoNTs-produkujícími druhy, ale i samotnými neurotoxiny. V současnosti je zaznamenáno víc než 30 podtypů botulotoxinů a očekává se jejich další nárůst [51]. Na základě antigenních vlastností však odlišujeme 7 základních typů botulotoxinů (označovány A–G), z nich člověka ohrožují A, B, E, F [51]–[53]. V roce 2016 k nim byl přidán osmý typ, BoNT/FA [54]. Rovněž platí, že určitý typ BoNTs může být produkován rozličnými druhy rodu *Clostridium*. Příchod éry moderní molekulární biologie umožnil určit také míru heterogenity jak *bont* genu, tak neurotoxinů a na jejím základě rozeznat jednotlivé podtypy pro daný sérotyp toxinu; například dnes 6 známých podtypů pro BoNT/A se mezi sebou liší v aminokyselinové sekvenci až o 16 % [51].

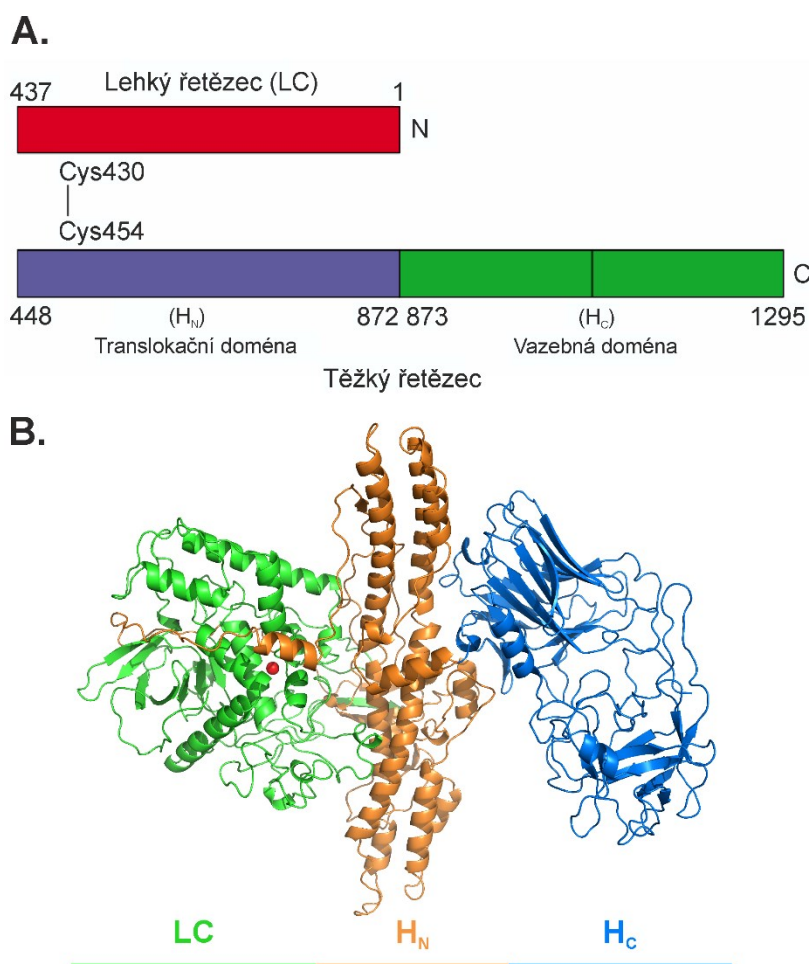
1.3.1 Struktura BoNTs a jejich působení na organismus

V bakteriálním supernatantu se toxin nenachází samotný, ale ve formě velkých multiproteinových komplexů (L-TCs) tvořených molekulou neurotoxinu a netoxickými, s toxinem asociovanými proteiny (NAPs; z angl. *nontoxic neurotoxin-associated proteins*) [55],[56],[57]. Montecucco a jeho spolupracovníci zjistili, že specifita účinku a neurotoxicita je zprostředkována výhradně 150kDa molekulou botulotoxinu. Botulotoxiny jsou produkovány ve formě inaktivních jednořetězcových polypeptidových molekul obsahujících smyčku, která se štěpí vlivem proteas, přičemž vznikají dva řetězce – 50kDa *N*-terminální lehký (LC) a 100kDa *C*-terminální těžký (H_N a H_C), které jsou spojené jedním disulfidickým můstkem. Zatímco úloha lehkého řetězce je katalytická, těžký je odpovědný za vazbu molekuly botulotoxinu na receptor (H_C) a jeho translokaci do buňky (H_N). V buňkách nervového systému dochází k redukci vazby mezi řetězci

a k uvolnění aktivního LC [51],[53]. Obrázek 9 zobrazuje schéma aktivace molekuly toxinu, obrázek 10 zjednodušenou strukturu s důrazem na polohu disulfidické vazby a krystalovou strukturu botulotoxinu typu A (BoNT/A).

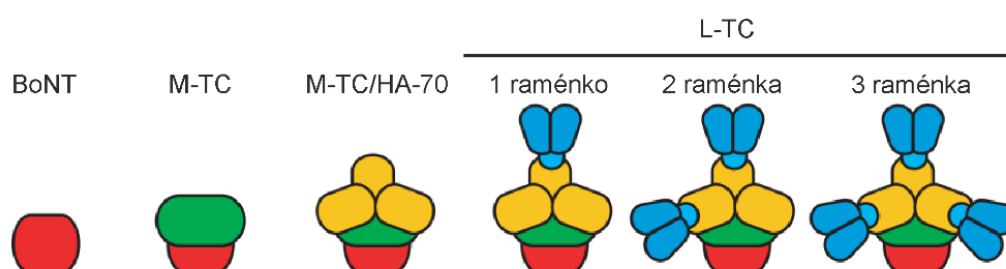


Obr. 9. Zjednodušené schéma aktivace molekuly toxinu. Prvním krokem je proteolytické štěpení bakteriálními nebo tkáňovými proteasami, následováno redukcí disulfidické vazby a disociací lehkého řetězce v nervových buňkách. Převzato a upraveno z [55].



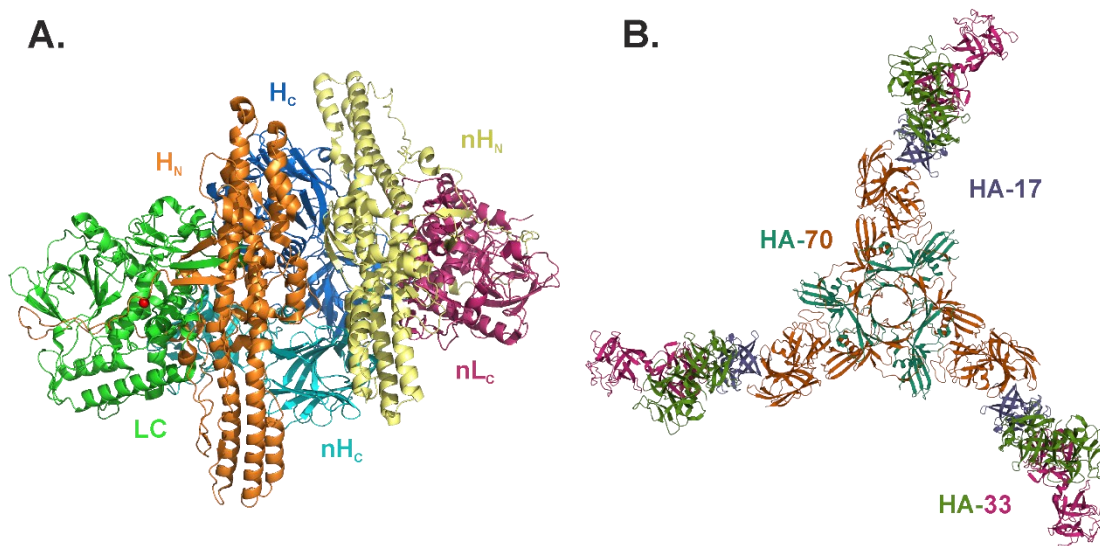
Obr. 10. A. Schematicky zobrazená struktura botulotoxinů pro ukázkou spojení řetězců disulfidickou vazbou. Převzato a upraveno z [58]. **B.** Struktura botulotoxinu A, v níž jsou barevně odlišeny jednotlivé domény – katalytická (LC; **zeleně**), translokační (H_N ; **oranžově**) a receptor vázající (H_C ; **modře**). **Červeně** je znázorněn atom zinku v aktivním místě. Převzato z proteinové databanky (PDB kód: 3BTA) a upraveno na základě [56].

Skupinu NAPs tvoří jedna molekula NTNHA (z angl. *nontoxic nonhemagglutinin*) a komplex HA proteinů (z angl. *hemagglutinin*). Ten se skládá ze tří molekul HA-70, na které mohou být navázány až tři komplexy tvořené jednou molekulou HA-17 a dvěma molekulami HA-33. Kromě L-TC se v bakteriálních kulturách mohou vyskytovat i menší komplexy botulotoxinů – M-TC (BoNT/NTNHA), M-TC/HA-70 a nematurovaný L-TC, který na rozdíl od maturovaného L-TC neobsahuje všechny proteiny HA komplexu. Zmíněné komplexy jsou schematicky znázorněny na obrázku 11.



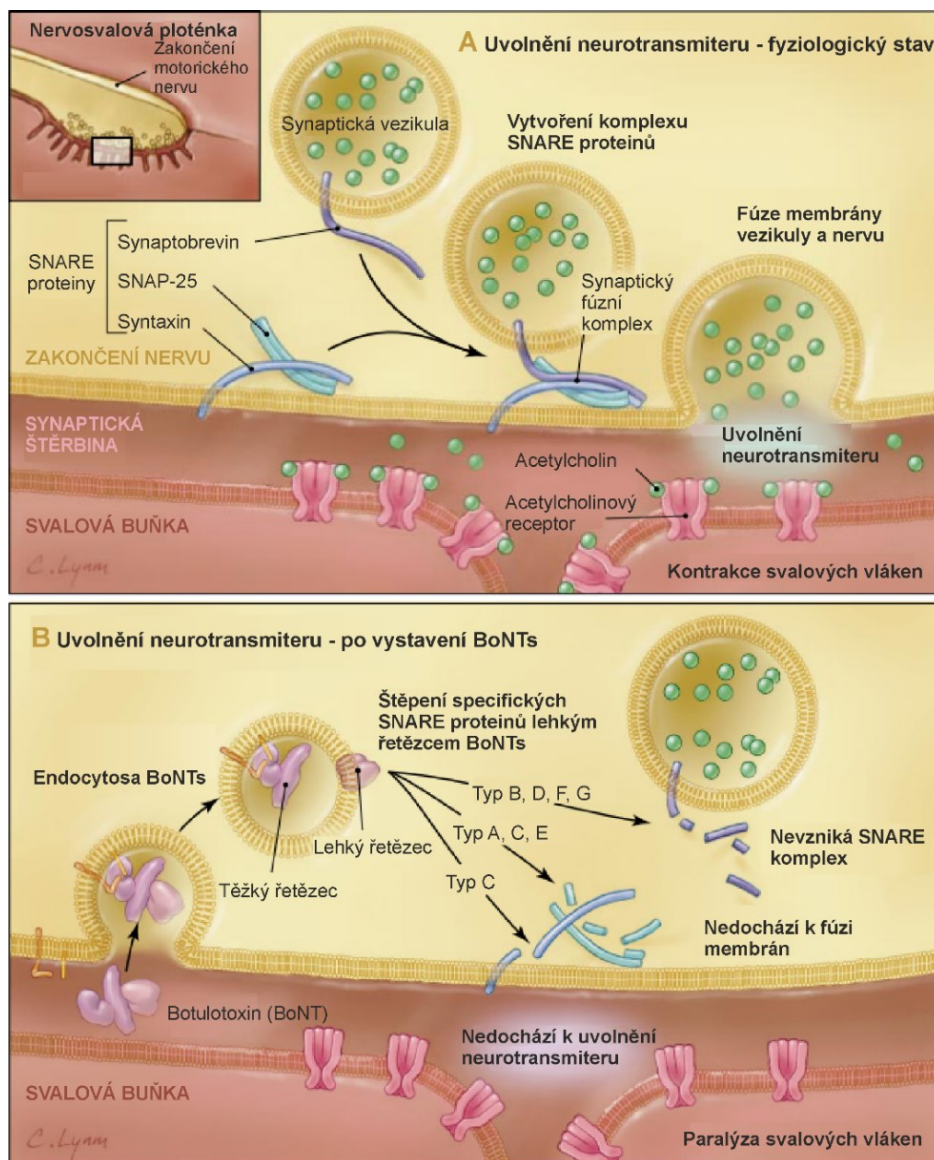
Obr. 11. Zjednodušená zobrazení jednotlivých komplexů, ve kterých se botulotoxiny mohou vyskytovat v bakteriálním supernatantu. Převzato a upraveno z [57].

Soubor vznikajících proteinových komplexů pro jednotlivé podtypy BoNT je podmíněn geny lokalizovanými v neurotoxinovém genovém klastru, jenž je ve většině případů unikátní. Bylo zjištěno, že všechny komplexy mají při orálním podání nižší letální dávku LD₅₀ než samotný botulotoxin [57],[59]. Tento poznatek vedl k domněnce, že asociace BoNTs s NAPs je pro daný způsob intoxikace zásadní. Gu a Rumpel zkoumáním interakce mezi BoNT/A a NTNHA zjistili, že při nízkém pH (pH≤3) nedochází k inaktivaci toxinu, pokud je v komplexu s NTNHA (M-TC). Rovněž se jim podařilo rozřešit krystalovou strukturu NTNHA (viz Obr. 12A) [56]. Ito a Sagane ve svém výzkumu srovnávali míru vazby a transportu monovrstvou buněk střevního epitelu mezi molekulou čistého toxinu, M-TC, M-TC/HA-70 a L-TCs s odlišným počtem HA-33/HA-17 raménkových struktur. Došli k závěrům, že každý z komplexů toxinu i toxin samotný jsou schopny vazby a přestupu monovrstvou, avšak se značně vyšší účinností jedno-, dvou- nebo tříraménkové L-TCs. Proteiny HA komplexu, HA-33 a HA-17, tedy slouží nejenom k ochraně toxinu před kyselým prostředím gastrointestinálního traktu, ale také usnadňují jeho vstup do oběhového systému organismu a následnou intoxikaci [57]. V roce 2013 byla poprvé úspěšně vyřešena krystalová struktura celého HA komplexu (viz Obr. 12B) [60].



Obr. 12. **A.** BoNT/A v komplexu s NTNHA. **B.** HA proteinový komplex. Struktury převzaty z proteinové databanky (PDB kód 3V0A (**A.**) a 3WIN (**B.**)) a upraveno podle [56],[60].

Z biochemického hlediska řadíme BoNTs mezi zinek-dependentní metaloproteasy, jejichž účinek spočívá ve štěpení alespoň jednoho z proteinů tvořících SNARE komplex v nervových zapojeních (z angl. *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) [55],[53]. Mezi SNARE proteiny patří synaptobrevin 2 (VAMP-2) nacházející se v membráně synaptické vezikuly nesoucí neurotransmitter a proteiny presynaptické membrány neuronu – syntaxin 1A a SNAP-25. Jejich asociace a následné vytvoření komplexu je klíčové pro uvolnění neurotransmiteru acetylcholinu, čímž dojde k přenosu impulsu nervovou synapsí a v konečném důsledku ke kontrakci svalu v nervosvalové ploténce. Proteolytickou aktivitou botulotoxinů dochází ke štěpení peptidového řetězce SNARE proteinů a zabránění vzniku komplexu. Důsledkem je přerušení přenosu nervového vzruchu s následnou ochablou paralýzou svalstva, která se postupně šíří, až zasáhne srdce a svaly potřebné po dýchání. Každý typ BoNT má své specifické místo štěpení na jednom ze SNARE proteinů. Výjimkou je BoNT/C, který má dvě aktivní místa, přičemž jeho substrátem jsou SNAP-25 a VAMP-2 [61]. Na obrázku 13 je detailní zobrazení nervosvalového zapojení za fyziologického stavu a v přítomnosti BoNTs [62].



Obr. 13. Porovnání dějů v nervosvalové ploténce za fyziologických podmínek (A) a po vystavení buňky botulotoxinu (B). Převzato a upraveno z [62].

1.3.1.1 Využití účinku BoNTs v medicíně

Botulotoxin byl prvním mikrobiálním toxinem použitým k léčbě lidských onemocnění. Přestože jeho injekční aplikace je v současnosti jednou z nejrozšířenějších kosmetických procedur, své uplatnění nachází hlavně v medicíně [63],[64]. První rozsáhlé klinické studie, při kterých se pro léčbu strabismu u lidí využíval botulotoxin, provedl v roce 1970 Dr. Alan Scott, chirurg působící na Očním výzkumném institutu Smith-Kettlewella v San Franciscu. Pracoval s jednou z hlavních klinicky dostupných forem botulotoxinu typu A – onabotulinumtoxinA – lépe známým pod obchodním názvem Botox®; dalšími formami jsou abobotulinumtoxinA (Dysport®) a incobotulinumtoxinA (Xeomin®). Na trhu se

nachází také jedna forma botulotoxinu typu B – rimabotulinumtoxinB (Myobloc®) – která se používá k léčbě cervikální dystonie. Na rozdíl od typu B, mají formy typu A uplatnění při kosmetických i terapeutických zákrocích, například při léčbě výše zmíněného strabismu, dále při léčbě blefarospazmu (abnormální kontrakce očního víčka), cervikální dystonie (nedobrovolná kontrakce krčního svalstva), axilární hyperhidrosy (nadměrné pocení podpaží), spasticity horních končetin (zvýšený svalový tonus v klidovém stavu), chronické migrény či úniku moči. Estetickými zákroky jsou nejčastěji upravovány linie obličeje.

1.3.2 Detekce BoNTs

Botulotoxiny se se střední letální dávkou LD_{50} v rozmezí 1–5 ng/kg živé hmotnosti řadí k nejučinnějším toxinům na světě. Kvůli jejich vysoké toxicitě a účinnosti mají své místo i na seznamu rizikových agens bioterorismu. Z hlediska úspěšné léčby je klíčovým faktorem časně a správně určení přítomnosti konkrétního typu ve vzorku. Při detekci se kladou nároky hlavně na citlivost metody, která by měla mít limit detekce v oblasti hodnot koncentrace toxinu v $pg \cdot ml^{-1}$, na její specifitu vůči jednotlivým sérotypům a jejich podtypům jak v čisté formě, tak vázané v komplexech a v neposlední řadě na kompatibilitu se širokou škálou povahy zkoumaných vzorků. Přídavnou hodnotu mají atributy jako jednoduchost, robustnost či možnost automatizace. Jedním z přístupů je využití endopeptidasové aktivity BoNTs, jiné pak využívají dříve zmíněnou heterogenitu mezi jednotlivými podtypy – detekují přítomnost DNA bakterií *C. botulinum*, *baratii* a *butyricum*. Také je možnost stanovit přímo molekuly toxinu pomocí hmotnostní spektrometrie [50],[51].

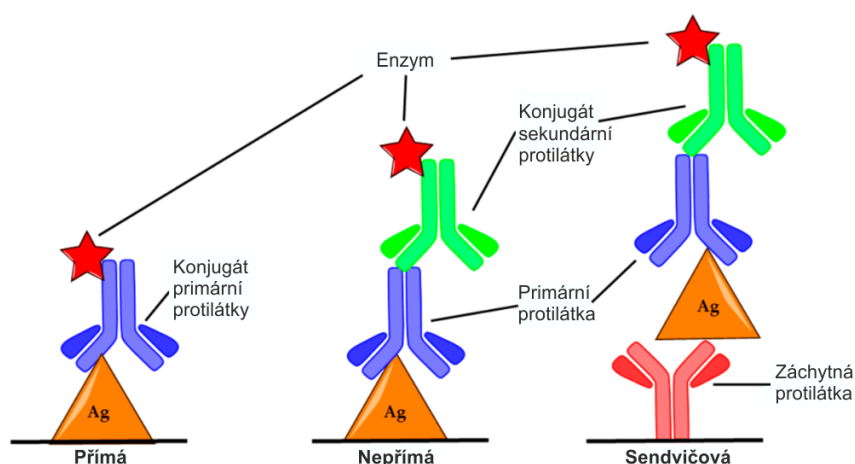
1.3.2.1 Biologické testy na myších

Biologické testy na myších (MBA, z angl. *mouse bioassay*) [50],[61] jsou nejběžnější metodou pro detekci aktivních BoNTs. Potýkají se ale se značným počtem nevýhod. Patří mezi ně již samotná skutečnost, že se jedná o testy na zvířatech a s ní spojená složitá legislativní opatření a povinnosti z ní vyplývající. Nevýhodou je také časová náročnost experimentu, až v délce trvání 4 dnů. Mezi další negativa lze zahrnout osobní rizika spojená s injekčním podáním vzorků zvířatům, potřeba speciálních zařízení pro práci s nimi a celková cena experimentu. Naopak, velkou výhodou této metody je její vysoká citlivost, přičemž limit detekce se pohybuje v hodnotách desítek $pg \cdot ml^{-1}$.

Pro prosté určení přítomnosti či nepřítomnosti aktivního botulotoxinu je vzorek podezřelý z přítomnosti BoNT myším injekčně podán do dutiny břišní a následně jsou pozorovány příznaky intoxikace, mezi které patří tzv. husí kůže, zúžení pasu, paralýza zadních končetin a dušnost vedoucí až ke smrti zvířete. Při kvantifikaci toxinu se pracuje se dvěma parametry – maximální ředění vzorku působící a minimální ředění nezpůsobující uhynutí zvířete. Biologické testy na myších mohou být využity i ke stanovení konkrétního sérotypu přítomného botulotoxinu. V tomto případě jsou myším podány spolu se vzorkem i neutralizující protilátky, antitoxiny. Zvířata, kterým byla podána protilátka odpovídající toxinu ve vzorku jsou asymptomatické a přežijí, zatímco ostatní vykazují výše zmíněné příznaky botulismu.

1.3.2.2 ELISA

Jednou z imunologických metod sloužících k detekci BoNTs je ELISA (z angl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) [50],[65]. Jejím principem je stanovení přítomnosti určitého antigenu s využitím protilátek modifikovaných enzymem, jehož reakce se substrátem vede ke měřitelné barevné změně roztoku. Existují tři uspořádání – přímé, nepřímé a sendvičové (viz Obr. 14) – lišící se mezi sebou ve vazbě antigenu a v počtu použitých protilátek. V prvních dvou případech je antigen, vázaný na mikrotitrační destičku, vystaven přímo protilátce s konjugovaným enzymem (přímá ELISA) nebo primární protilátce, která následně interaguje se sekundární protilátkou modifikovanou enzymem (nepřímá ELISA). Při sendvičovém provedení je antigen vázán na mikrotitrační destičku prostřednictvím záchytné protilátky, další postup je shodný s nepřímou metodou ELISA.



Obr. 14. Jednotlivá uspořádání metody ELISA – přímé, nepřímé a sendvičové. **Přímá ELISA** – na antigen (Ag) se váže protilátka konjugovaná s enzymem, který zodpovídá za detekovatelnou

změnu roztoku. **Nepřímá ELISA** – antigen interaguje s primární protilátkou, na kterou se následně váže sekundární protilátka s konjugovaným enzymem. **Sendvičová ELISA** – antigen nejdříve interaguje se záchytní protilátkou a metoda dále pokračuje jako nepřímá ELISA. Převzato a upraveno z [50].

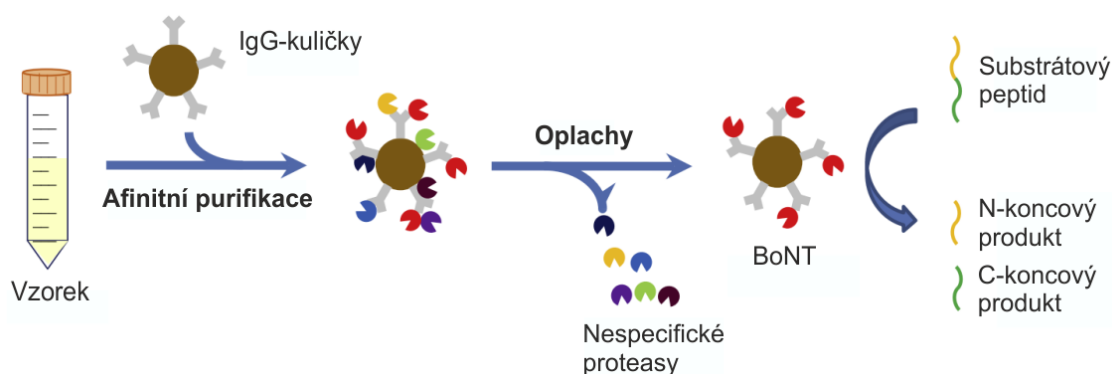
K detekci BoNTs je zpravidla využívána sendvičová ELISA. Oproti biologickým testům na myších je tato metoda rychlejší, trvání experimentu je 5–6 hodin, ale méně citlivá [66]. Jelikož principem je rozpoznávání specifických antigenních míst toxinu místo jeho endopeptidasové aktivity, nejedná se o funkční test. Nevýhodou metody je komplikace při vyšetřování komplexních vzorků (jídlo, bakteriální kultury, klinické vzorky či vzorky odebrané z životního prostředí), kde se BoNTs vyskytují v komplexech s NAPs, které blokují antigenní místa a znemožňují tak vazbu protilátky. Proto je tato metoda uplatňována častěji pro rychlé ověření (z angl. *screening*) přítomnosti BoNTs, přičemž výsledky musí být dále ověřeny testy na myších [50],[61],[67].

1.3.2.3 EndoPep-MS

Průlomem byla metoda nazvaná EndoPep-MS vyvinutá v laboratoři profesora Johna R. Barra [50],[61],[68]. Zkratka je odvozena z anglického názvu *Endopeptidase Mass Spectrometry* a principem je spojení vysoce specifické endopeptidasové aktivity BoNTs s detekcí produktů enzymatické reakce pomocí hmotnostní spektrometrie. Jedná se o rychlou a účinnou metodu schopnou detekce, diferenciaci a kvantifikace aktivity botulotoxinů typu A, B, E a F využívající oligopeptidy specifické pro jednotlivé sérotypy. K analýze reakčních směsí je nejčastěji využita hmotnostní spektrometrie s MALDI ionizačním zdrojem (laserová desorpce a ionizace za účasti matrice) a analyzátozem doby letu (MALDI-TOF-MS) nebo tandemová hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem, které předchází vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC-ESI/MS/MS) [61].

Prvotní experimenty [61],[68] využívaly syntetické peptidy, jejichž sekvence se až na malé změny shodovala se sekvencí okolí místa štěpení příslušného proteinu SNARE komplexu. Peptid pro BoNT/A měl navíc na obou koncích (C- i N-konec) navázanou molekulu biotinu pro nabohacení produktů reakce (fragmentů substrátového peptidu) z komplexní matrice. Ke zjištění případné křížové reakce byly připraveny reakční směsi, ve kterých se nacházely všechny čtyři oligopeptidy, ale vždy jen jeden toxin. HPLC-ESI/MS/MS analýza umožnila kromě diferenciaci jednotlivých sérotypů BoNTs i jejich kvantifikaci, při použití vnitřních ¹³C isotopově značených peptidových standardů.

V rámci těchto experimentů byly rovněž testovány i některé komplexní vzorky, konkrétně ze stolice a potravin, ve kterých bylo zjištěno štěpení substrátových oligopeptidů proteasami nacházejícími se v těchto vzorcích. Ačkoli to nevedlo k falešně pozitivnímu výsledku, limit detekce se značně zhoršil, jelikož BoNTs nebyly schopny tyto peptidy rozeznat. Tato skutečnost vedla k zavedení nového systému, ve kterém byl toxin před inkubací se substrátovým peptidem nejdříve pomocí protilátky imobilizován na magnetických kuličkách extrahován z komplexní matrice (viz Obr. 15), jako například lidské sérum [69], mléko [70], stolice [71] nebo různé potraviny [72]. Zpočátku byly využívány jak polyklonální, tak monoklonální protilátky; postupně se upřednostňovaly monoklonální. Byl navržen soubor monoklonálních protilátek s vysokou afinitou k BoNTs a žádným nebo zanedbatelným vlivem na endopeptidasovou aktivitu [73],[74]. Ve snaze zvýšit účinnost metody a její limit detekce byly také optimalizovány jednotlivé substrátové peptidy [75],[76],[77],[78].



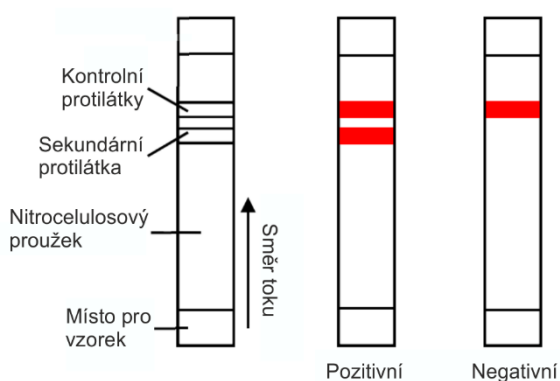
Obr. 15. Schéma metody EndoPep-MS s krokem extrakce toxinu z komplexní matrice s využitím protilátek vázaných na magnetické kuličky. Výsledná směs, obsahující peptidy vzniklé působením BoNTs, C- a N-koncový peptid, je následně analyzována pomocí MALDI-TOF-MS nebo HPLC-ESI/MS/MS. Převzato a upraveno z [78].

Mezi přednosti EndoPep-MS patří vysoká specifita určení sérotypu BoNT, vysoká citlivost (limit detekce může být v závislosti vzorku menší než při biotestech na myších) a kompatibilita s nejrůznějšími matricemi (jídlo, sérum, stolice, půda, bakteriální kultury a jiné).

1.3.2.4 Ostatní metody detekce BoNTs

Existuje značné množství dalších metod a způsobů detekce BoNTs, ať už aktivního nebo samotné molekuly toxinu. Zajímavé je například využití imunochromatografických metod založených na laterálním toku (LFAs; z angl. *Lateral flow assays*) [50]. Principem je interakce mezi toxinem a protilátkou konjugovanou s koloidním zlatem. Vzorek po

nanesení s tímto konjugátem migruje nitrocelulosoovým proužkem k místu se sekundární protilátkou, na kterou se v případě, že je vzorek pozitivní váže a způsobí barevnou změnu; nadbytek vzlíná dál ke kontrolním protilátkám a je pozorována další barevná změna, která je znakem správnosti testu (viz Obr. 16). Velkou výhodou LFAs je jednoduchost provedení (nevyžadují žádné speciální vybavení) a následná analýza výsledků, časová nenáročnost (výsledek do 15 minut) a nízká cena. Jako mnoho imunologických metod, včetně ELISA, nejsou ale schopny rozlišit přítomnost aktivního toxinu. Také mají oproti ELISA metodě mnohem nižší citlivost (řádově desítky $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$) [79]. Jsou tedy vhodnými pomocníky do terénu, ale zjištěné výsledky musí být ověřeny. V roce 2017 byla metoda modifikována pro detekci BoNT/A v patientských sérech [80]; ke vzorku byl přidán peptid značený na jednom konci biotinem a na druhém histidinovou kotvou (His-tag). V místě pro aplikaci vzorku jsou nanočástice zlata konjugované se streptavidinem (biotin-vázající protein). Po rozštěpení peptidu toxinem nedochází k vazbě na protilátku v testovací linii (protilátka proti His-tag) a pozitivní výsledek má tedy viditelný jen kontrolní proužek, kde se nachází protilátka proti streptavidinu.



Obr. 16. Schéma imunochromatografického testu pro detekci BoNTs s náčrtem vzhledu pozitivního a negativního výsledku. Převzato a upraveno z [50].

Další možností je využití polymerázové řetězové reakce (PCR; z angl. *Polymerase chain reaction*) v metodě zvané imuno-PCR [50]. Ve své podstatě představuje obměněnou ELISA metodu, rozdíl je v tom, že vzniklý komplex antigen-protilátka není detekován enzymatickou reakcí, ale přes streptavidin, který se váže na biotinem modifikovanou molekulu DNA. Tyto fragmenty jsou následně amplifikovány buď tradiční, nebo kvantitativní PCR (q-PCR). Metoda byla optimalizována pro typ A, s limitem detekce srovnatelným s testy na myších. Potenciál této metody nahradit biotesty na myších je umocněn schopností stanovit hladinu aktivního toxinu [81],[82].

Detekovat aktivní BoNTs umožňuje fluorescenční rezonanční přenos energie (FRET; z angl. *Fluorescence resonance energy transfer*) [50], kdy je endopeptidasová aktivita BoNTs sledována pozorovatelnou změnou fluorescence substrátu. Krátký oligopeptid, navržen podle jejich přirozeného cílového proteinu, má na každém konci jednu značku – donor (fluorofor) a akceptor (chromofor) fluorescence. V přítomnosti BoNTs dochází ke štěpení oligopeptidu a disociaci značek, čím je přenos energie zastaven [81],[82]. Značnou nevýhodou je ale náchylnost k poskytování falešně pozitivních výsledků v důsledku štěpení substrátu nespecifickými proteasami, které se mohou ve vzorku vyskytovat. Z toho důvodu jsou prakticky nevyužitelné pro detekci v klinických či potravinových vzorcích. Nevýhodou je také jejich nižší citlivost oproti biotestem na myších [61].

Dalším z přístupů je využití protilátek specifických pro štěpné produkty botulotoxinové aktivity [83]. Takto byla stanovena přítomnost BoNT/B v jídle, kdy došlo nejprve ke štěpení substrátového peptidu (navržen na základě struktury cílového proteinu pro BoNT/B – VAMP-2) na imunokoloně s navázaným toxinem. Poté byla reakční směs nanesena na mikrotitrační destičku se streptavidinem, kde došlo k navázání biotinylovaných C-koncových fragmentů. Ty byly stanoveny spektrofotometricky, s využitím primární protilátky specifické pro tyto fragmenty a vůči ní specifické sekundární protilátky s navázanou křenovou peroxidasou, která po přidání substrátu indukuje barevnou změnu roztoku. Metoda je citlivostí srovnatelná s biotesty na myších.

2 Cíle

Stanovení limitu detekce peptidových produktů aktivity BoNT/A1 pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie s využitím afinitních nosičů modifikovaných:

- biotin-vázajícím proteinem neutravidinem,
- protilátkami specifickými vůči BoNT/A1, bez vlivu na jeho aktivitu.

3 Experimentální část

3.1 Seznam použitého materiálu a přístrojů

3.1.1 Přístroje a pomůcky

analytické váhy	<i>Mettler Toledo, Švýcarsko</i>
automatické pipety	<i>Mettler Toledo, Švýcarsko</i>
centrifuga 5424 R	<i>Eppendorf, Německo</i>
centrifugační zkumavkové filtry (PVDF 0,22 µm)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
depoziční zařízení	<i>Mikrobiologický ústav AV ČR</i>
digitální multimetr Fluke 179 TRUE RMS	<i>Fluke networks, USA</i>
hmotnostní spektrometr 15T solarix XR FT-ICR (ESI a MALDI ionizační zdroj)	<i>Bruker Daltonics, Německo</i>
hmotnostní spektrometr AutoflexSpeed MALDI-TOF	<i>Bruker Daltonics, Německo</i>
laminární box biohazard BSC-EN 2-4	<i>MERCI, ČR</i>
mikrostříkačka Hamilton (250 µl)	<i>Hamilton, Švýcarsko</i>
naklápěcí třepačka	<i>Benchmark Scientific, USA</i>
pH metr Orion2	<i>Star Thermo Scientific, USA</i>
porcelánová třecí miska s tloučkem	<i>P-LAB, ČR</i>
skleněné povrchy s oxidem indium a cínem (ITO; In ₂ O ₃ /SnO ₂)	<i>Bruker Daltonics, Německo</i>
sonikační lázeň Sonorex RK52H	<i>Bandelin, Německo</i>
stolní centrifuga miniSpin	<i>Eppendorf, Německo</i>
suchý blok ThermoMixer C	<i>Eppendorf, Německo</i>
vortex Wizard	<i>Velp Scientifica, Itálie</i>

3.1.2 Programy

Compass DataAnalysis 5.0	<i>Bruker Daltonics, Německo</i>
flexAnalysis 3.3	<i>Bruker Daltonics, Německo</i>
PyMOL 2.0	<i>Schrödinger, USA</i>

3.1.3 Chemikálie

1,4-dithiothreitol (DTT)	<i>Serva, Německo</i>
acetonitril, LiChrosolv® hypergrade LC-MS	<i>Merck, Německo</i>
dihydrogenfosforečnan draselný (KH ₂ PO ₄)	<i>Lach-ner, ČR</i>
ethanol, Uvasol® pro spektroskopii	<i>Merck, Německo</i>
granulované krmivo pro psy	<i>Tesco, ČR</i>
hovězí sérový albumin (BSA)	<i>Serva, Německo</i>
hydrogenfosforečnan sodný (dodekahydrát) (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	<i>Lach-Ner, ČR</i>
hydrogenuhličitan amonný (NH ₄ HCO ₃)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
chlorid draselný (KCl)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
chlorid sodný (NaCl)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
chlorid zinečnatý (ZnCl ₂)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
kyselina α-kyano-4-hydroxyskořicová (CCA)	<i>Bruker Daltonics, Německo</i>
kyselina trifluoroctová (TFA)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
methanol, LiChrosolv® hypergrade LC-MS	<i>Merck, Německo</i>
N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina (HEPES)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
neutravidin	<i>Thermo Scientific, USA</i>
peptidový kalibrační standard II	<i>Bruker Daltonics, Německo</i>
rekombinantní botulotoxin A1 (BoNT/A1)	<i>RKI, Německo</i>
voda, LiChrosolv® hypergrade LC-MS	<i>Merck, Německo</i>

3.1.3.1 Peptidový standard pro BoNT/A

N-koncový peptid K*GSNRTRIDQGNQ	<i>Peptide 2.0, USA</i>
C-koncový peptid RATRLLGGK*	<i>Peptide 2.0, USA</i>
Substrátový peptid 1 K*GSNRTRIDQGNQRATRLLGGK*	<i>Peptide 2.0, USA</i>
Substrátový peptid 2 Ac-OOEKAPARGFNKPKIDAGNGRATR-Nle-LGGR-NH ₂	<i>Caslo ApS, Dánsko</i>

(* biotin, Ac acetyl, O 2-naphtylalanin, Nle norleucin)

3.1.3.2 Protilátky proti BoNT/A1

A1688	RKI, Německo
CR2	CDC, USA
HcA78	RKI, Německo
RAZ1	CDC, USA

Všechny uvedené protilátky jsou myší monoklonální proti určité doméně BoNT/A1, bez vlivu na aktivitu toxinu.

3.1.3.3 Pufry a roztoky

Roztok pro depozici a oplachy povrchů modifikovaných neutravidinem – $50 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ hydrogenuhličitan amonný, pH 7,9

Pufr pro oplachy povrchů modifikovaných protilátkou (1× PBS pufr) – $137 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chlorid sodný, $2,7 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chlorid draselný, $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ hydrogenfosforečnan sodný, $1,8 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ dihydrogenfosforečnan draselný, pH 7,4

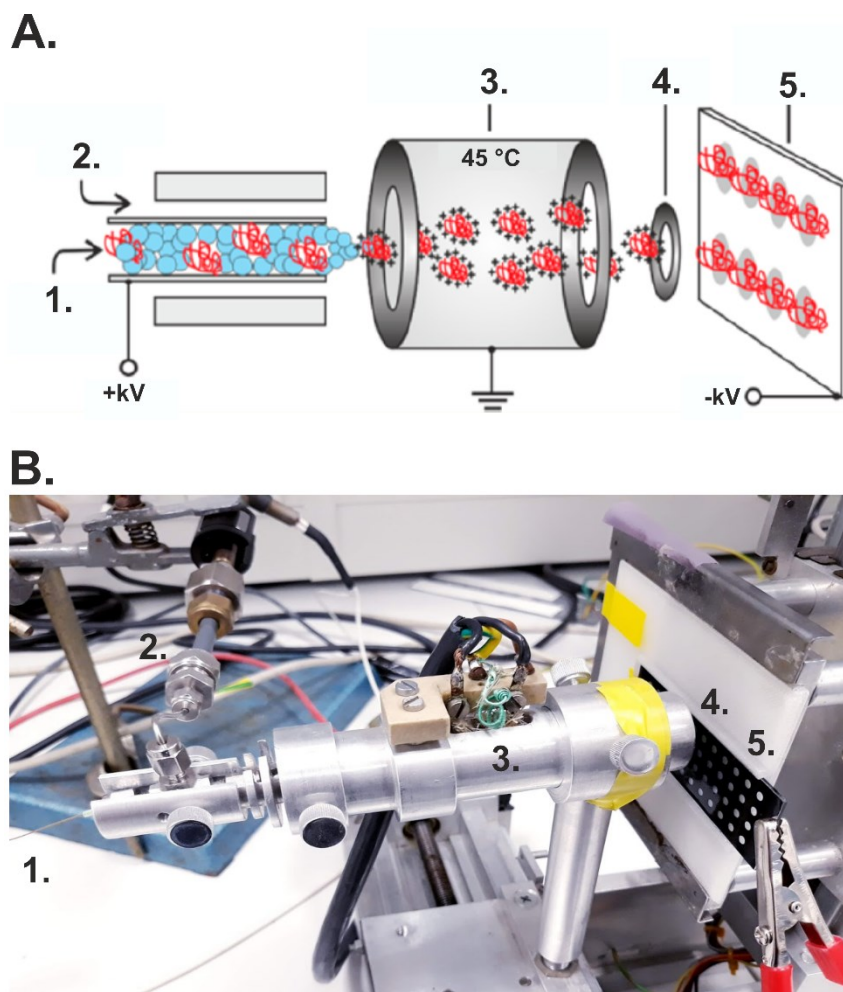
Reakční pufr pro BoNT – $5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HEPES, $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chlorid zinečnatý, $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 1,4-dithiothreitol, $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ hovězí sérový albumin, pH 7,3

3.2 Experimentální metody

3.2.1 Funkcionalizace povrchů

Afinitní nosiče byly v této diplomové práci připraveny pomocí depozičního zařízení, které k funkcionalizaci využívá metodu měkkého přistávání iontů za atmosférického tlaku, AISL (z angl. *Ambient Ion Soft Landing*). Schéma i fotografie tohoto zařízení jsou zobrazeny na obrázku 17. Povrchy určenými k modifikaci byly komerčně dostupná sklíčka s vrstvou oxidu india a cínu (ITO, z angl. *indium tin oxide*) na jedné straně o rozměrech $75 \times 25 \times 1,1 \text{ mm}$. Před umístěním do zařízení byla na vodivou stranu nalepena maska udávající požadovanou geometrii – počet a rozmístění míst určených k modifikaci. Byly využity dva typy těchto masek, s rozložením pozic 2×8 a 4×12 . V prvním případě byly na povrchu vytvořeny dvě řady bodů po osmi pozicích,

vzdálených vzájemně o 9,0 mm. V druhém případě byly vytvořeny 4 řady po 12 pozicích s odstupy 5,4 mm. Průměr jedné pozice byl pro oba typy uspořádání 2,0 mm.



Obr. 17. Depoziční zařízení (**A.** Schéma přístroje. Převzato a upraveno z [33]. **B.** Fotografie přístroje.) použité k přípravě afinitních nosičů. Jednotlivé části zařízení představují přívod roztoku proteinu (1.), nosného plynu (2.), desolvatační trubici (3.) a masku určující geometrii modifikovaných pozic (4.) nalepenou na povrchu určenému k modifikaci (5.).

Roztok deponovaného proteinu byl pomocí pumpy s mikrostríkačkou (objem 250 μl) uveden průtokovou rychlostí 1 $\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ do elektrospreje s kapilárou o průměru 100 μm . V desolvatační trubici o délce 10 cm a vnitřním průměru 4,0 mm došlo působením inertního plynu dusíku o tlaku 2,5 bar a teplotě 45 °C k vysušení solvatačního obalu molekul proteinu a jejich následné depozici na ITO povrch. Z vysokonapěťového zdroje bylo na spojení mikrostríkačky a kapiláry přiváděno napětí +1,5 kV a na destičku –1,5 kV; desolvatační trubice byla uzemněna. Každý bod byl exponován elektrospreji po dobu 300 s; na jedné pozici bylo tedy deponováno 5 μl roztoku proteinu. Před použitím afinitního povrchu z něj byla maska odstraněna, povrch byl na naklápací třepačce opláchnut 1× v deionizované vodě po dobu asi 5 minut a ponechán uschnout.

K přípravě neutravidinových povrchů byl zásobní roztok tohoto proteinu o koncentraci $50 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ zředěn 50mM roztokem hydrogenuhličitanu amonného ve vodě (LC-MS kvalita) (pH 7,9) na koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Tento roztok byl vždy připraven čerstvý, zásobní roztoky byly uchovávány při teplotě -20°C .

Imunoafinitní nosiče byly připraveny použitím čtyř různých myších monoklonálních protilátek proti BoNT/A1, bez vlivu na jeho aktivitu. K dispozici byly dvě protilátky rozeznávající epitopy na těžkém řetězci molekuly BoNT/A1 o koncentraci $7 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), označené CR2 a RAZ1. Další testované protilátky, A1688 se specifitou pro translokační doménu molekuly toxinu (o koncentraci $9 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ($1,3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)) a HcA78 pro těžký řetězec (o koncentraci $11 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ($1,6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)) byly poskytnuty Institutem Roberta Kocha v Berlíně. Protilátky byly uchovávány při teplotě -80°C . Pro deponování byly všechny protilátky ředěny 50mM hydrogenuhličitanem amonným (pH 7,9) na koncentraci $4 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

3.2.1 Příprava reakčních směsí s toxinem BoNT/A1

Reakční směsi s toxinem sloužily nejenom ke stanovení limitu detekce, ale sehrávaly i úlohu kontroly aktivity toxinu při experimentech s toxinem v komplexní matici. Tyto dvě sady reakčních směsí byly připraveny a stanoveny vždy paralelně. Veškerá práce s botulotoxinem byla z hlediska bezpečnosti prováděna v laminárním boxu.

Zásobní roztoky BoNT/A1 o koncentraci $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byly uchovávány při teplotě -80°C . V experimentech s povrchy modifikovanými neutravidinem byl jako substrátový peptid použit peptid o hmotnosti 2878,5 Da, se sekvencí aminokyselin K*GSNRTRIDQ–GNQRATRLLGGK* a s navázaným biotinem (*) na obou koncích. Tento peptid je dále označován jako *Pep*. Pro EndoPep-MS byly nejdříve připraveny roztoky toxinu o koncentracích 200; 20; 2; 0,2 a $0,02 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ty byly následně smíchány s roztokem *Pep* o koncentraci $20 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ v poměru 1 : 1; celkový objem reakčních směsí byl 30 μl . K ředění toxinu i *Pep* byl použit reakční pufr pro BoNT (složení viz kapitola 3.1.3.3 *Pufry a roztoky*), do kterého byl hovězí sérový albumin přidán až těsně před použitím. Výsledné koncentrace BoNT/A1 v reakčních směších byly 100; 10; 1; 0,1 a $0,01 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ a *Pep* $10 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Zároveň byla připravena jedna kontrolní směs, ve které byl podíl toxinu nahrazen reakčním pufrem.

Pro afinitní povrchy modifikované protilátkami proti BoNT/A1 byly ze zásobního roztoku BoNT/A1 (koncentrace $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) připraveny roztoky o koncentraci toxinu 100;

10; 1; 0,5; 0,1 a 0,01 ng·ml⁻¹. Také byl připraven roztok substrátového peptidu o koncentraci 10 μmol·dm⁻³, kterým byl v těchto experimentech peptid o hmotnosti 3285,6 Da a sekvencí aminokyselin Ac-OOEKAPARGFNKPKIDAGNGRATR-Nle-LG-GR-NH₂ (Ac představuje acetyl, O 2-naphtylalanin, Nle norleucin) (peptid je dále označován jako Pep). V kontrolní směsi byl toxin nahrazen reakčním pufrům.

3.2.2 Příprava reakčních směsí s toxinem BoNT/A1 v komplexní matrici

Reakční směsi s toxinem v komplexní matrici byly připraveny pěti různými způsoby. Jako základ této matrice bylo vybráno suché granulované krmivo pro psy (*Tesco*), dále označováno jen jako krmivo. Celkově bylo vyzkoušeno pět odlišných postupů přípravy reakčních směsí toxinu v krmivu, podle kterých jsou jednotlivé experimenty označeny N° 1–5 (viz Obr. 18, str. 40). Ve všech připravených reakčních směších jsou výsledné koncentrace BoNT/A1 100; 10; 1; 0,1 a 0,01 ng·ml⁻¹ a *Pep* 10 μmol·dm⁻³. Optimalizace byla provedena na površích modifikovaných neutravidinem.

3.2.2.1 Experiment N° 1

První experiment spočíval ve vyzkoušení postupu Státního veterinárního ústavu, převzatém z Bakteriologického analytického manuálu (vydáván FDA, USA) [84]. Nejdříve byly ředěním zásobního roztoku BoNT/A1 reakčním pufrům (složení viz kapitola 3.1.3.3 *Pufry a roztoky*) připraveny roztoky o koncentracích toxinu 200; 20; 2; 0,2 a 0,02 ng·ml⁻¹. Bylo naváženo 10 mg granulí nadrcených na částčky velké přibližně 0,5–1 mm. K nim bylo přidáno 100 μl toxinu v připravených koncentracích a směs byla ponechána inkubovat po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Suspenze byla následně stočena 10 min při 3 000× g, vzniklý supernatant byl oddělen a dále centrifugován 10 min při 10 000× g. Supernatant byl převeden do zkumavek s filtry o velikosti pórů 0,22 μm a centrifugován 20 min při 5 000× g. Všechny centrifugační kroky byly prováděny při teplotě 4 °C. Výsledný filtrát byl smíchán s roztokem *Pep* (koncentrace 20 μmol·dm⁻³) v poměru 1 : 1 tak, že výsledný objem reakčních směsí byl 30 μl. Dále byly připraveny dvě kontrolní reakční směsi: v první byl ke krmivu přidán jen reakční pufr, druhá obsahovala toxin (o koncentraci 10 ng·ml⁻¹) bez krmiva.

3.2.2.2 Experiment N° 2

V druhém experimentu byl postup kromě centrifugačních kroků shodný s N° 1. Z původních tří centrifugací byl ponechán jenom jeden – vzorky byly stočeny 10 min při $10\,000\times g$ a $4\,^{\circ}\text{C}$. Získaný extrakt byl následně smíchán s *Pep* v poměru 1 : 1.

3.2.2.3 Experiment N° 3

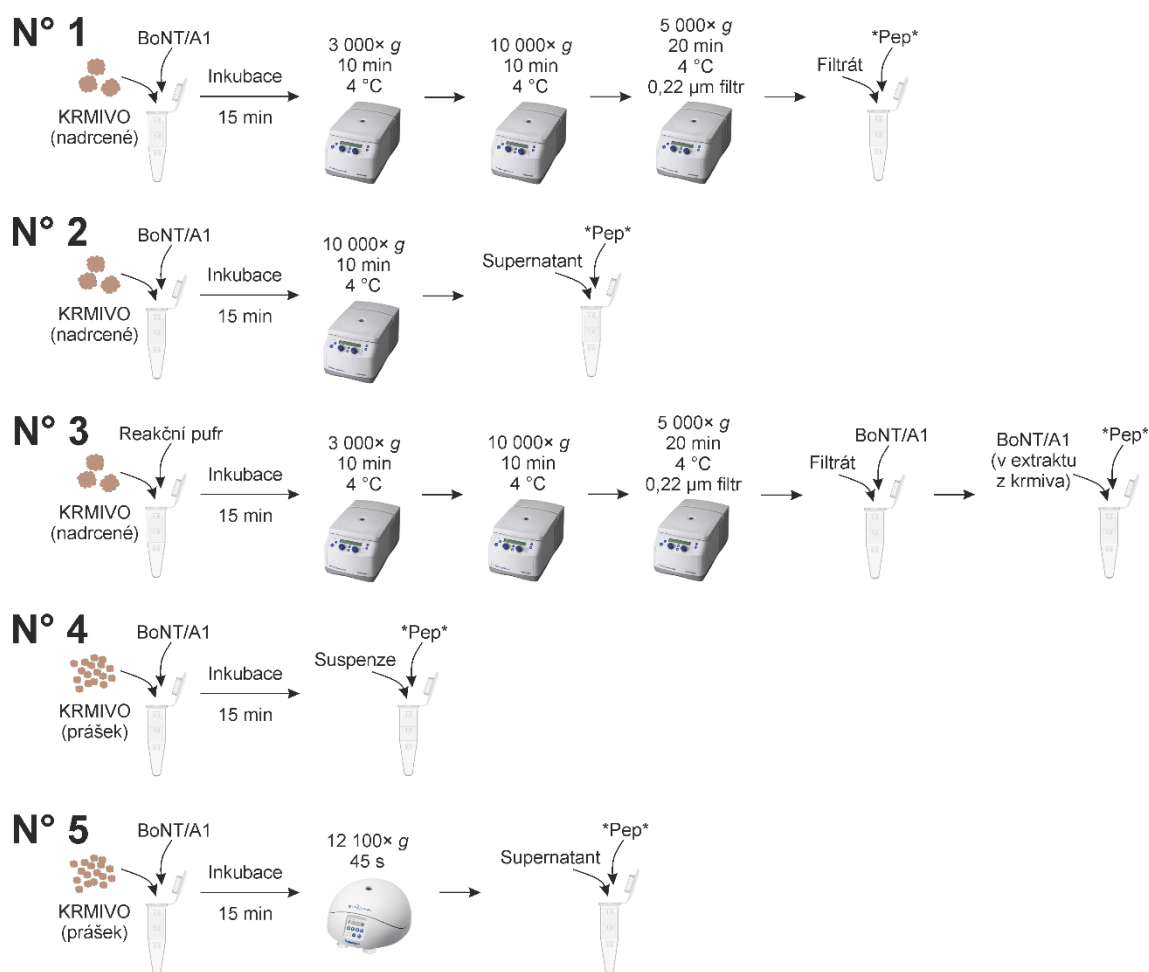
Dalším přístupem bylo přidání samotného reakčního pufru k nadrcenému krmivu. Filtrát, získaný provedením všech centrifugačních kroků popsanych v N° 1, byl použit k ředění toxinu. Reakční směsi i kontrolní reakční směsi s *Pep* byly připraveny podle postupu v N° 1.

3.2.2.4 Experiment N° 4

Čtvrtý experiment spočíval v rozemletí krmiva na jemný prášek v porcelánové třecí misce. K 10 mg takto připraveného krmiva byl přidán toxin (koncentrace stejné jako ve všech předešlých experimentech). Po 15 minutách inkubace byly připraveny reakční směsi smícháním roztoku obsahujícího toxin i částčky krmiva s *Pep* (v poměru 1 : 1). Zároveň byly pro porovnání připraveny reakční směsi použitím nadrceného krmiva podle postupu v N° 1.

3.2.2.5 Experiment N° 5

Další optimalizací postupu přípravy BoNT/A1 v komplexní matrici představovalo porovnání dvou sad reakčních směsí vzniklých použitím toxinu v krmivu rozemletém na prášek. Tyto sady se lišily tím, že v jedné byl substrátový peptid *Pep* smíchán s toxinem i s částčkami krmiva, jako v předchozím případě. V druhé byl naopak k peptidu přidán jenom supernatant získaný stočením vzorků na stolní centrifuge miniSpin po dobu 45 s při $12\,100\times g$.



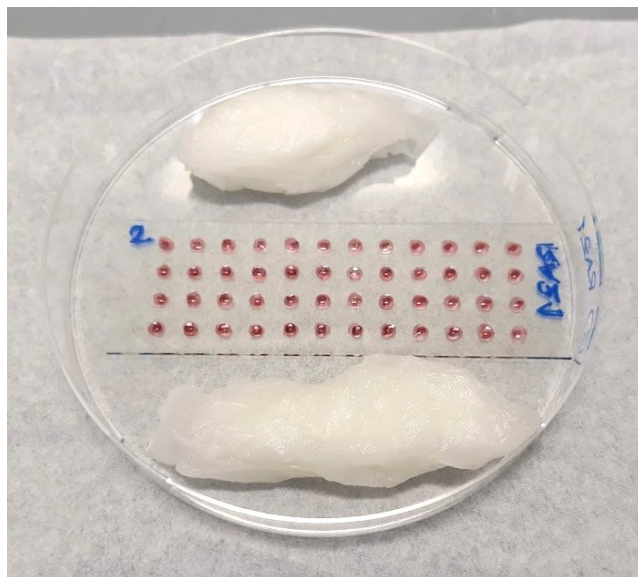
Obr. 18. Schematické znázornění přípravy komplexní matrice a výsledných reakčních směsí toxinu BoNT/A1 se substrátovým peptidem *Pep* v rámci experimentů N° 1–5.

3.2.1 EndoPep-MS ve spojení s afinitními nosiči

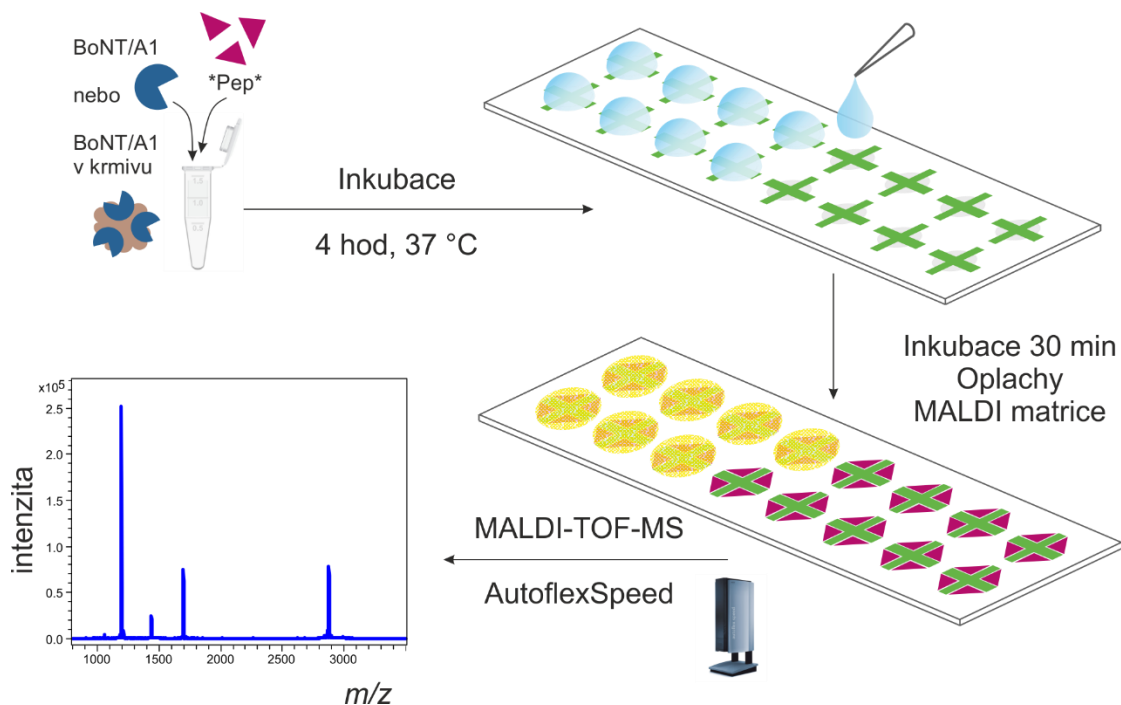
3.2.1.1 Neutravidinové povrchy

Reakční směsi připravené podle postupu popsáno v předchozích kapitolách (viz 3.2.2 Příprava reakčních směsí s toxinem BoNT/A1 a 3.2.3 Příprava reakčních směsí s toxinem BoNT/A1 v komplexní matrici) byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 4 hodin na zařízení ThermoMixer C (Eppendorf). Po uplynutí reakčního času byly vzorky stočeny při 12 100× g po dobu 45 s na stolní centrifuze miniSpin (Eppendorf). Na afinitní nosič modifikovaný neutravidinem byl aplikován 1 µl jednotlivých reakčních směsí, které byly ponechány inkubovat při laboratorní teplotě po dobu 30 min ve vlhkostní komoře, vytvořené pomocí Petriho misky s navlhčenými ubrousky (viz Obr. 19). Po inkubaci byly afinitní nosiče opláchnuty 2× 50mM roztokem hydrogenuhličitanu amonného (pH 7,9) tak, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků s nízkou koncentrací toxinu a následně

2× deionizovanou vodou. Po uschnutí byla nanášena MALDI matrice (postup přípravy viz kapitola 3.2.5. *MALDI-TOF-MS*). Zjednodušené schéma metody EndoPep-MS ve spojení s neutravidinovými nosiči je znázorněno na Obr. 20.



Obr. 19. Ukázka in situ nabohacení na afinitním nosiči ve vlhkostní komoře vytvořené použitím mokrých ubrousků.



Obr. 20. Schéma metody EndoPep-MS ve spojení s povrchy funkcionalizovanými neutravidinem. Reakční směsi, připraveny smícháním toxinu nebo toxinu v komplexní matici, byly po inkubaci nanášeny na neutravidinový povrch. Po nabohacení peptidů značených biotinem byla na

opláchnutý a suchý povrch aplikována MALDI matrice. Peptidové produkty botulotoxinové aktivity byly detekovány využitím MALDI-TOF hmotnostního spektrometru AutoflexSpeed.

3.2.1.1.1 Validace

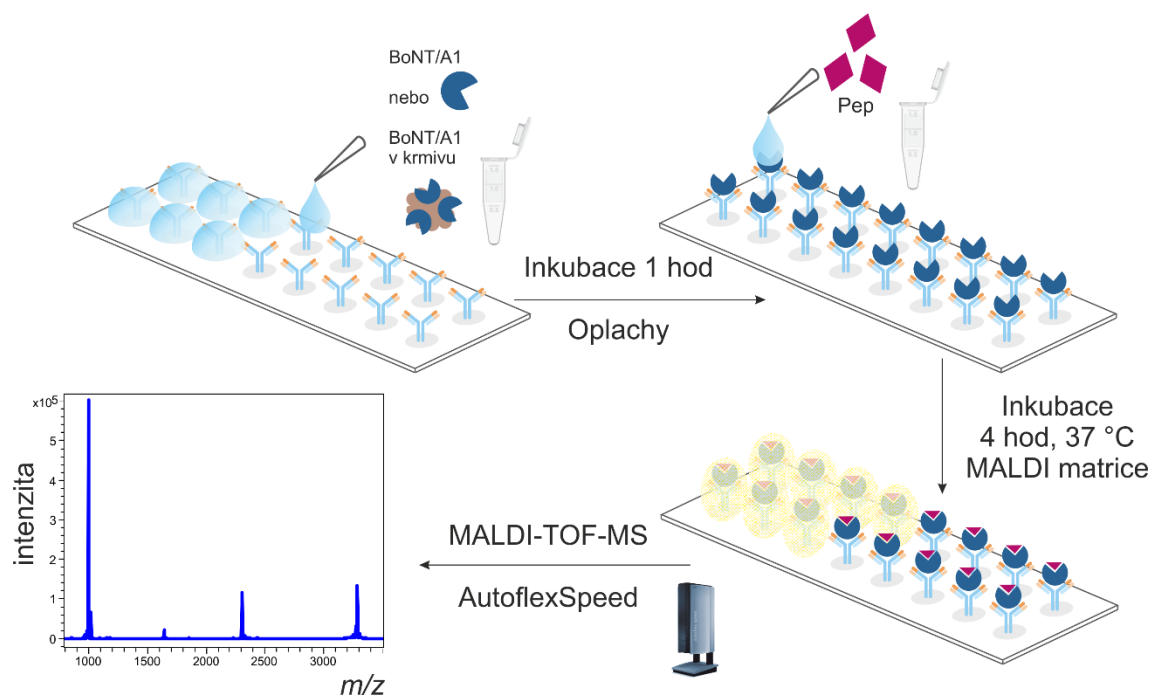
Komplexní směsi krmiva s toxinem obsahovaly krmivo rozemleté na jemný prášek a do reakčních směsí byl přidán vždy extrakt i s jeho částčkami. Výsledná koncentrace BoNT/A1 při reakci se substrátem byla 10; 1; 0,5; 0,1 a 0,01 ng·ml⁻¹ a *Pep* 10 μmol·dm⁻³. Zároveň byly sledovány dva reakční časy – 4 a 8 hodin. Reakční směsi byly nanášeny na 33 pozic modifikovaného povrchu, kontrolní reakce na 4 pozice. Paralelně byly připraveny i reakční směsi s čistým toxinem, které byly inkubovány také 4 a 8 hodin.

3.2.1.2 Imunoafinitní povrchy s anti-BoNT/A1 protilátkou

Na jednotlivé pozice byl pipetován 1 μl připravených roztoků BoNT/A1, vždy v kvadruplikátu. V případě roztoků toxinu v krmivu byly na povrch přidány i jeho částčky. Následovala inkubace při laboratorní teplotě ve vlhkostní komoře trvající 1 hodinu. Poté byl povrch opláchnut 3× PBS pufrém (složení viz kapitola 3.1.3.3 *Pufry a roztoky*) a 2× deionizovanou vodou. Po uschnutí byl na každou pozici nanášen 1 μl Pep o koncentraci 10 μmol·dm⁻³. Inkubace trvala 4 hodiny při 37 °C v Petriho misce se speciálním držákem ve víčku (viz Obr. 21); v spodní části byl reakční pufr, aby se co nejvíce předešlo vysychání roztoku Pep. Držák pro povrch navrhla a na 3D tiskárně vytiskla Ing. Jana Fialová (MBÚ, AV ČR). Po uplynutí reakčního času byla na jednotlivé pozice aplikována MALDI matrice (postup přípravy viz kapitola 3.2.5. *MALDI-TOF-MS*). Zjednodušené schéma postupu metody EndoPep-MS ve spojení s imunoafinitními nosiči s protilátkou proti BoNT/A1 je znázorněno na obrázku 22.



Obr. 21. Držák afinitního nosiče pro umístění do víčka Petriho misky.



Obr. 22. Schéma metody EndoPep-MS ve spojení s povrchy funkcionalizovanými anti-BoNT/A1 protilátkami. Toxin o různých koncentracích byl nanesen na povrch. Po inkubaci trvající 1 hodinu byl na opláchnutý a suchý povrch aplikován substrátový peptid Pep. Po 4hodinové reakci s toxinem byly suché pozice převrstveny MALDI matricí a peptidové produkty botulotoxinové aktivity byly detekovány využitím MALDI-TOF hmotnostního spektrometru AutoflexSpeed.

3.2.1 MALDI-TOF-MS

Na povrchy s reakčními produkty toxinové aktivity byl aplikován 1 μ l 1% roztoku kyseliny trifluoroctové (TFA) v 50% acetonitrilu (ACN). Po uschnutí byly jednotlivé pozice převrstveny 0,7 μ l MALDI matrice, kterou byla ve všech experimentech této diplomové práce kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (HCCA). Roztok MALDI matrice byl připraven smícháním jejího nasyceného roztoku v methanolu s 50% ACN v poměru 1 : 2. Nasycený roztok byl před smícháním s ACN sonikován 1 min v sonikační lázni a centrifugován 45 s při 12 100 \times g.

Peptidové produkty botulotoxinové aktivity byly detekovány pomocí MALDI-TOF hmotnostního spektrometru AutoflexSpeed (*Bruker Daltonics*). Připravené povrchy byly umístěny do držáku kompatibilního s tímto zařízením. Kvůli použití funkce náhodného krokování terčíku (z angl. *random walk*) byl přístroj nastaven na aktuálně použitou geometrii masky (2 \times 8 nebo 4 \times 12). Jednotlivé pozice byly změřeny v pozitivním reflektorovém módu při celkovém počtu pulsů laseru 10 000 a jejich

frekvenci 2 000 Hz nebo 500 Hz. Frekvence pulsů laseru 500 Hz byla použita při validačním testu a všech experimentech s imunoafinitními nosiči. Detekční rozsah byl 800–3 500 *m/z* a získaná spektra byla vyhodnocena v programu flexAnalysis 3.3 (*Bruker Daltonics*). Ke kalibraci sloužil peptidový kalibrační standard II od společnosti *Bruker Daltonics*. Primární aminokyselinové sekvence použitých substrátových peptidů i příslušných produktů BoNT/A aktivity jsou spolu se sledovanými hodnotami *m/z* shrnuty v tabulce 1.

Tab. 1. Použité substrátové peptidy pro BoNT/A a jejich peptidové produkty, včetně primární aminokyselinové sekvence a sledované hodnoty *m/z*.

substrátový peptid	peptidové produkty	<i>m/z</i>
Pep		2878,5
K*GSNRTRIDQGNQRATRLGKK*		
	N-koncový* (NT*)	1699,7
	K*GSNRTRIDQGNQ	
	C-koncový* (CT*)	1197,8
	RATRLGKK*	
Pep		3286,8
Ac-OOEKAPARGFNKPKIDAGNGRATRXLGGR-NH ₂		
	N-koncový (NT)	2307,1
	Ac-OOEKAPARGFNKPKIDAGNG	
	C-koncový (CT)	998,6
	RATRXLGGR-NH ₂	

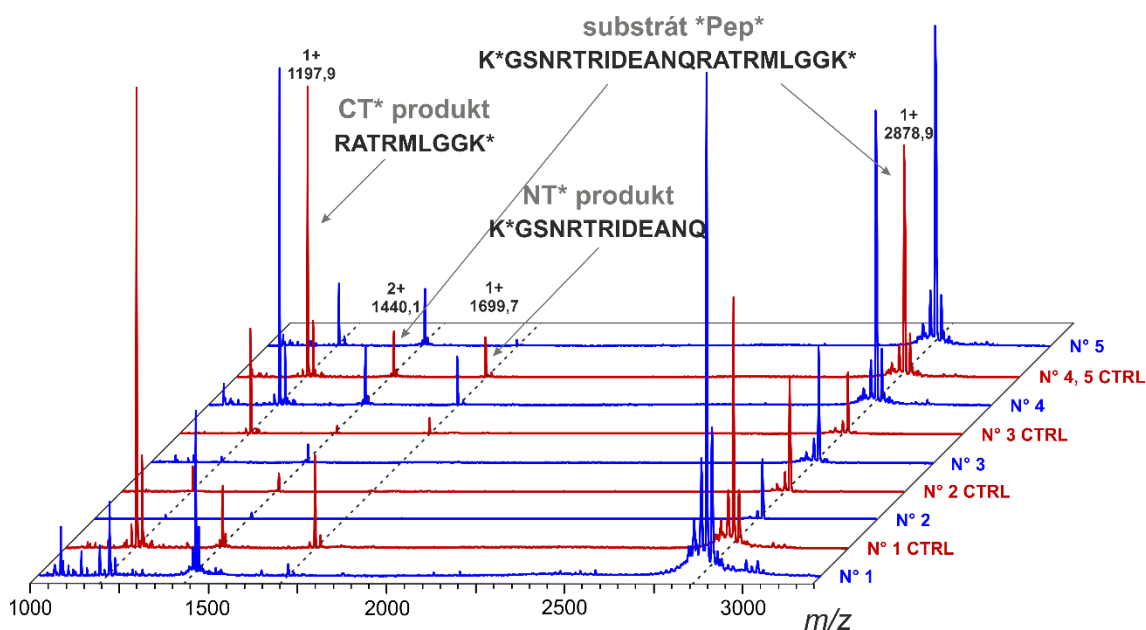
(* biotin, Ac acetyl, O 2-naphtylalanin)

Hmotnostní spektrometr s iontově cyklotronovou rezonancí a Fourierovou transformací s MALDI ionizačním zdrojem (MALDI-FT-ICR) byl použit pro analýzu produktů toxinové aktivity u vybraných nosičů. Spektra byla vyhodnocena v programu Compass DataAnalysis 5.0 (*Bruker Daltonics*).

4 Výsledky

4.1 Detekce BoNT/A1 pomocí afinitních nosičů modifikovaných neutravidinem

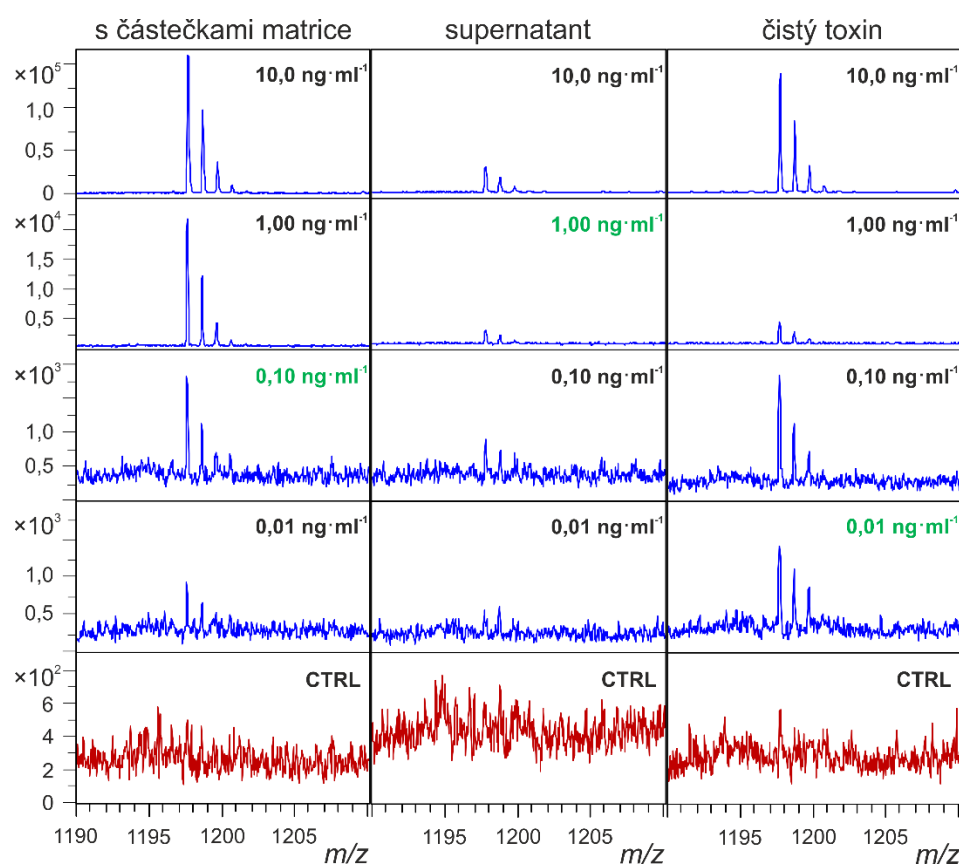
Při detekci toxinu BoNT/A1 v komplexní matici, v našem případě suchém granulovaném krmivu pro psy (dále jen krmivo), byly na neutravidinových površích reakční směsi se substrátovým peptidem *Pep* připraveny několika různými způsoby, podle kterých byly jednotlivé experimenty označeny N° 1–5 (viz Obr. 18, str. 40). Jejich podrobný popis se nachází v kapitole 3.2 *Experimentální metody*. Pro koncentraci BoNT/A1 $10 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ byl zhotoven obrázek 23, zachycující změny ve spektrech napříč jednotlivými experimenty. Spektra patřící reakčním směsím s toxinem s extraktem z krmiva jsou v něm zobrazeny modře, červeně reakční směsi s čistým toxinem.



Obr. 23. Jednotlivá spektra pro experimenty N° 1–5 v reakční směsi s extraktem z krmiva (*modře*) na neutravidinových površích a v reakční směsi s BoNT/A1 (*červeně*) o koncentraci $10 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, nabohacených pomocí neutravidinového povrchu. Pro experiment N° 4 a 5 je společná kontrola, jelikož experimenty byly provedeny současně. V obrázku jsou zároveň uvedeny sekvence jednotlivých peptidů – substrátového, C- a N-terminálního produktu – i jejich nábojové stavy a sledovaná hodnota m/z .

Nejlépších výsledků, co se týče poměru intenzity signálu C-terminálního produktu (CT*) pro reakci s čistým toxinem a toxinem v komplexní matici (v obou případech byla koncentrace toxinu $10 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$), bylo dosaženo při experimentech N° 4 a N° 5. Ty se lišily

přípravou výsledných reakčních směsí; v případě N° 4 byl toxin v komplexní matrici přidán k substrátovému peptidu *Pep* i s částčkami matrice (krmiva), při N° 5 byla matrice nejdříve centrifugována a pro inkubaci s *Pep* byl použit jen supernatant. Obrázek 24 zobrazuje intenzity signálu CT* (m/z 1197,8) pro jednotlivé koncentrace toxinu a způsob přípravy reakčních směsí s toxinem v komplexní matrici (N° 4 a 5) a samotným toxinem. Ve spektrech je zeleně vyznačena hodnota koncentrace BoNT/A1, při které bylo dosaženo limitu detekce. Limitem detekce byla považována intenzita signálu, která odpovídá minimálně čtyřnásobku intenzity hladiny šumu ($S/N > 4$, z angl. *signal-to-noise ratio*).

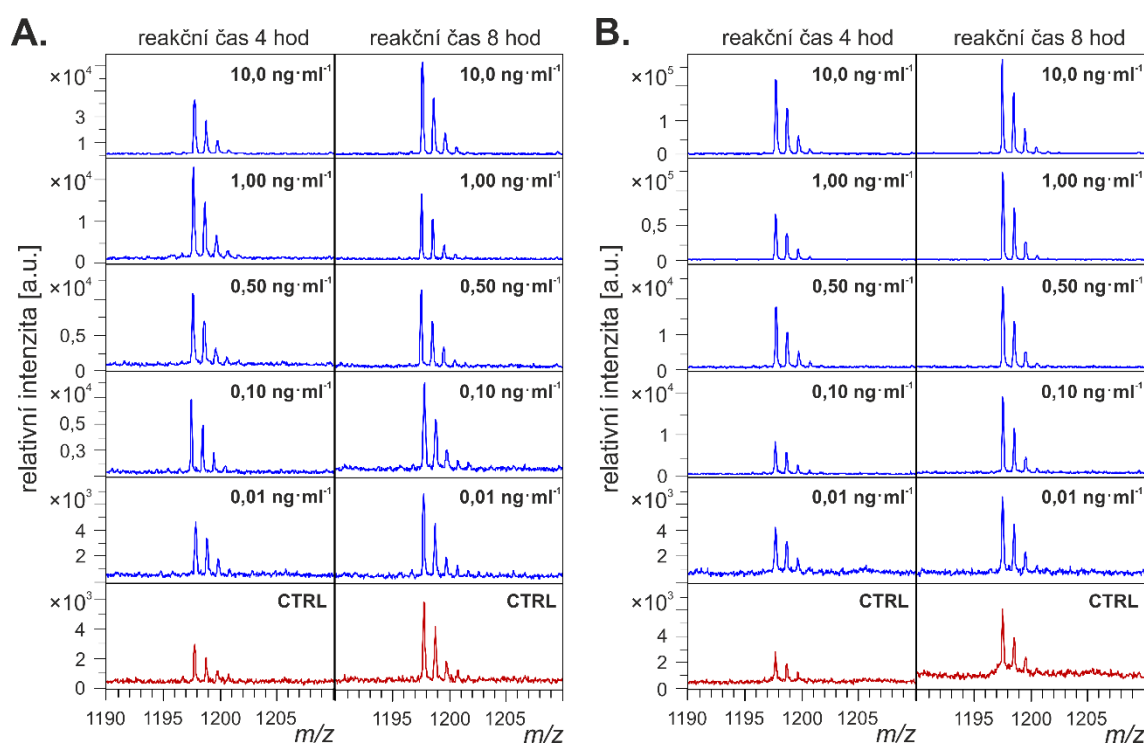


Obr. 24. Spektra získaná z experimentů N° 4 (výsledné reakční směsi s částčkami krmiva) a N° 5 (výsledné reakční směsi bez částček krmiva) v porovnání s reakčními směsi se samotným toxinem, přibližně na CT* (m/z 1197,8). U každého spektra je uvedena koncentrace BoNT/A1 v příslušné reakční směsi; CTRL představuje kontrolní reakční směs bez přídavku toxinu. **Zeleně** je vyznačen limit detekce.

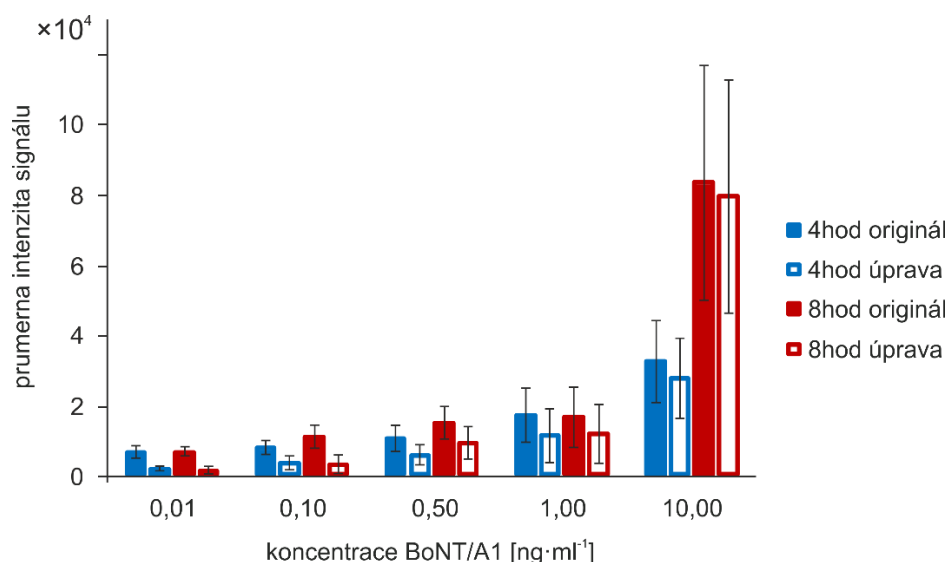
4.1.1 Validace

V rámci validačního testu povrchů modifikovaných neutravidinem pro detekci aktivního BoNT/A1 v komplexní matrici byly reakční směsi pipetovány na afinitní nosiče ve větším počtu multiplikátů (33 pozic pro každou reakční směs s toxinem, 4 pozice pro kontrolní

reakci) tak, že vždy se na jednom povrchu nacházely jenom reakční směsi pro příslušnou koncentraci toxinu v krmivu a kontrolní reakce bez přidavku toxinu. Zároveň byly srovnávány dva reakční časy – 4 a 8 hodin. Obrázek 25 představuje porovnání intenzity signálu CT* peptidu pro jednotlivé koncentrace toxinu v krmivu (25A) a bez krmiva (samotný toxin) (25B) pro reakční čas 4 nebo 8 hodin. Na obrázku 26 je znázorněn graf závislosti průměrné intenzity signálu před a po odečtení průměrné intenzity signálu kontroly (bez šumu) na koncentraci toxinu v komplexní matici pro oba sledované reakční časy. Údaje potřebné pro zhotovení daného grafu se nachází v tabulce 2.



Obr. 25. Porovnání sérií reakčních směsí s toxinem v krmivu (**A.**) a samotným toxinem (**B.**) pro reakční čas 4 a 8 hodin. Spektra jsou přiblížena na CT* (m/z 1197,8) a je v nich vždy vyznačena příslušná koncentrace BoNT/A1.



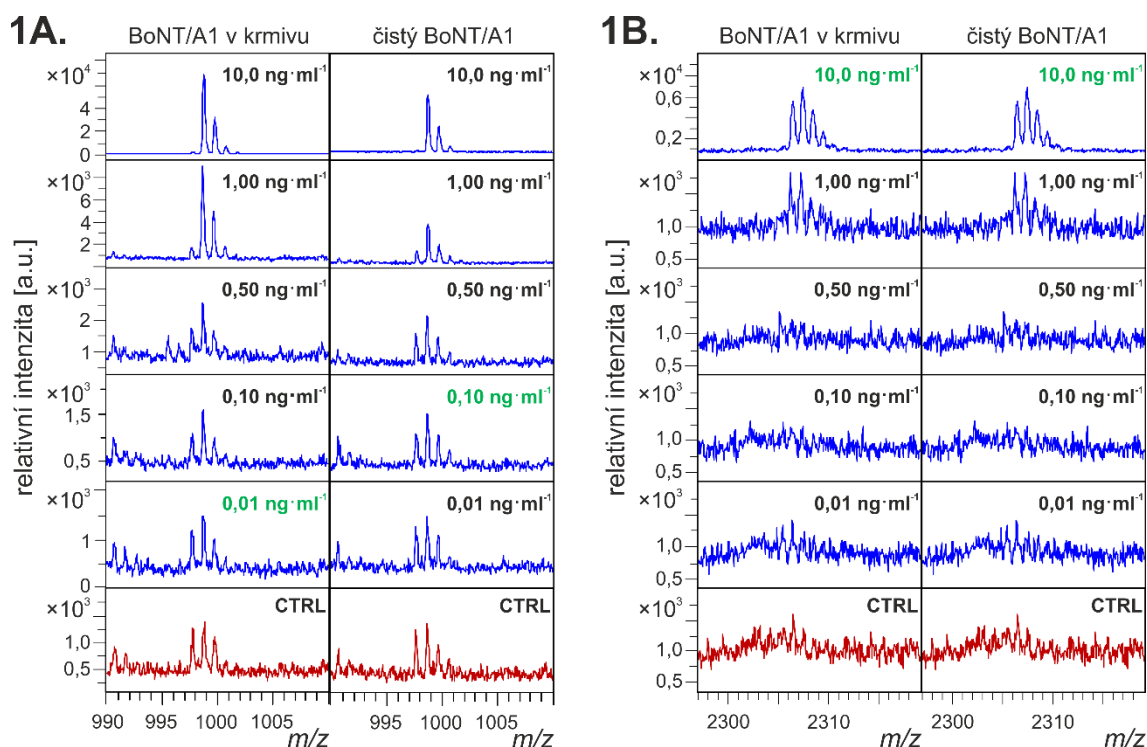
Obr. 26. Graf závislosti průměrné intenzity původního signálu (**originál**) a signálu po odečtení kontroly (**úprava**) na koncentraci toxinu v komplexní matrici při inkubaci reakčních směsí 4 (**modře**) a 8 (**červeně**) hod.

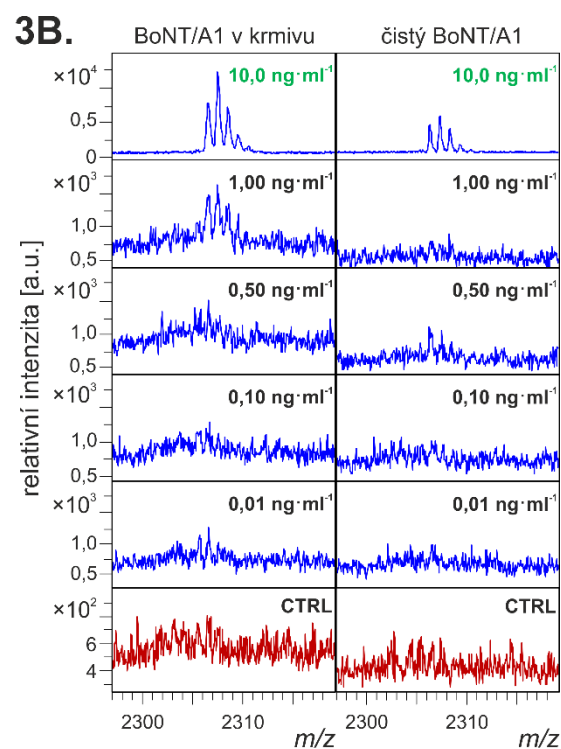
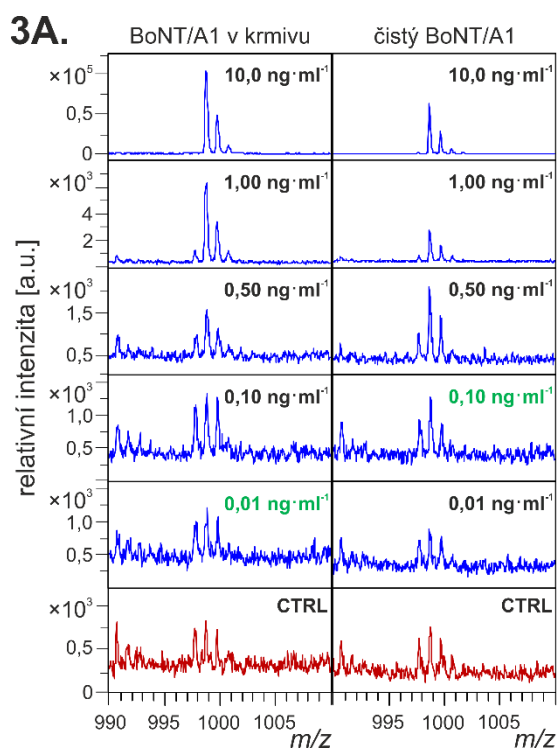
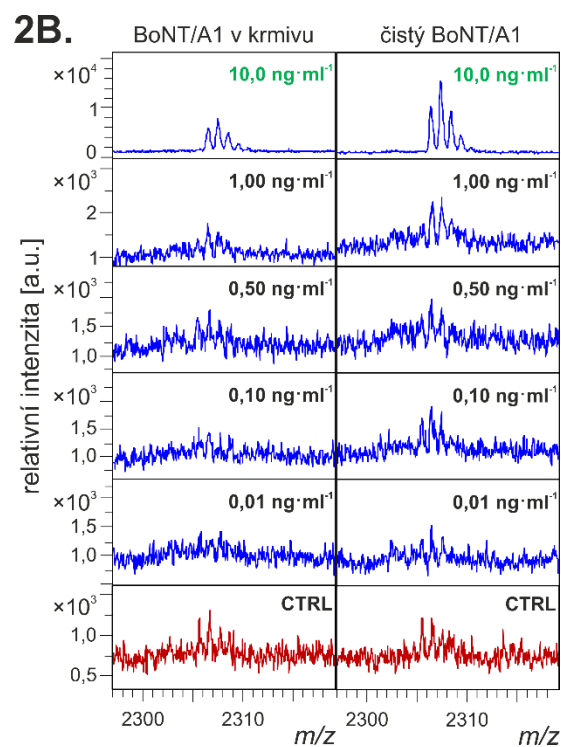
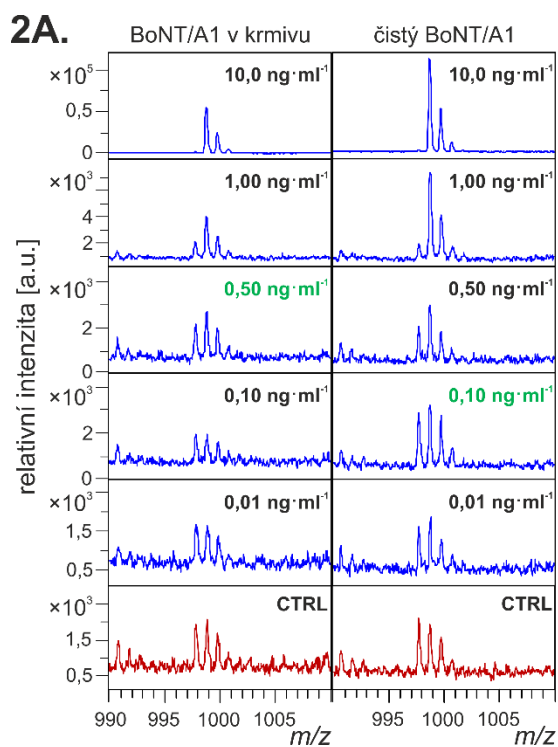
Tab. 2. Tabulka hodnot intenzit CT* peptidu pro jednotlivé koncentrace toxinu pro dva reakční časy (4 a 8 hod). \bar{I} – hodnota průměrné intenzity signálu před (**originál**) a po odečtení průměrného signálu kontrolní reakce (**úprava**), s – směrodatná odchylka a s_r % – relativní směrodatná odchylka vyjádřena v procentech.

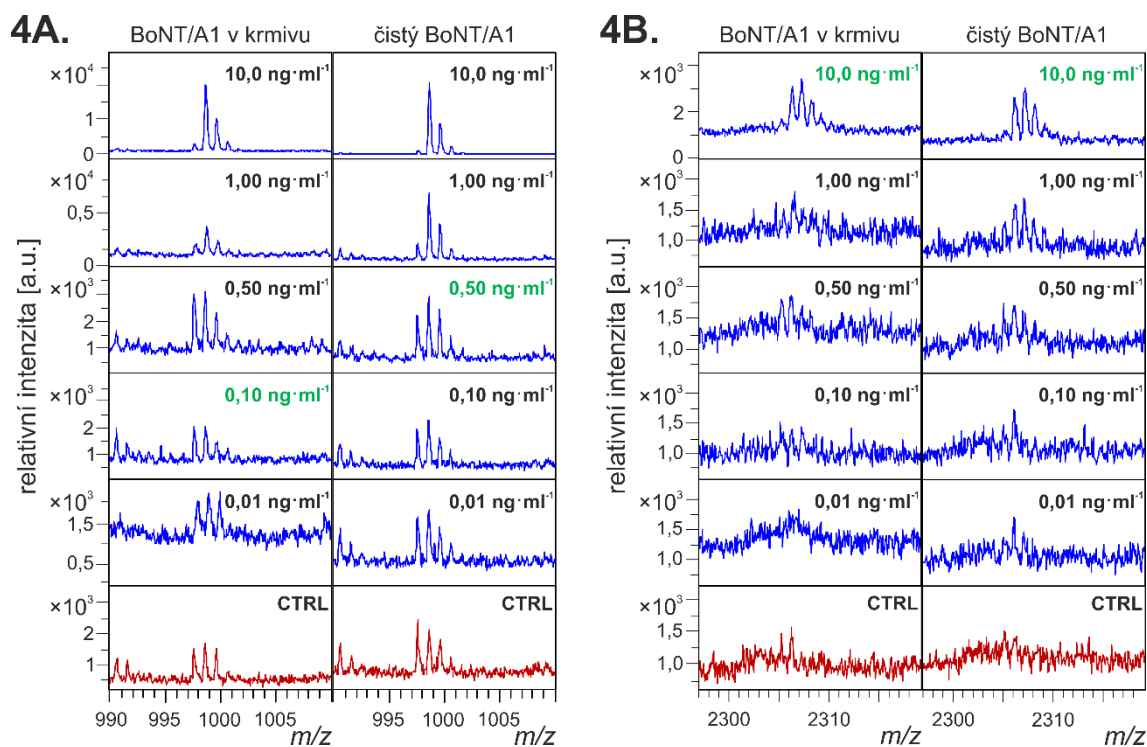
		4 hod			8 hod		
c (BoNT/A1)	data	\bar{I}	s	s_r	\bar{I}	s	s_r
$\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$		$\cdot 10^4$	$\cdot 10^3$	%	$\cdot 10^4$	$\cdot 10^3$	%
10,0	originál	3,20	11,7	37	8,30	33,4	40
	úprava	2,74	11,5	42	7,93	33,2	42
1,00	originál	1,70	7,83	46	1,65	8,46	51
	úprava	1,10	7,64	69	1,14	8,36	73
0,50	originál	1,03	3,82	37	1,44	4,75	33
	úprava	0,56	3,01	54	0,87	4,70	54
0,10	originál	0,74	2,10	29	1,05	3,21	31
	úprava	0,30	1,89	63	0,28	2,61	92
0,01	originál	0,63	1,61	25	0,61	1,32	21
	úprava	0,12	0,61	51	0,11	0,99	88

4.1 Detekce BoNT/A1 pomocí povrchů modifikovaných protilátkou

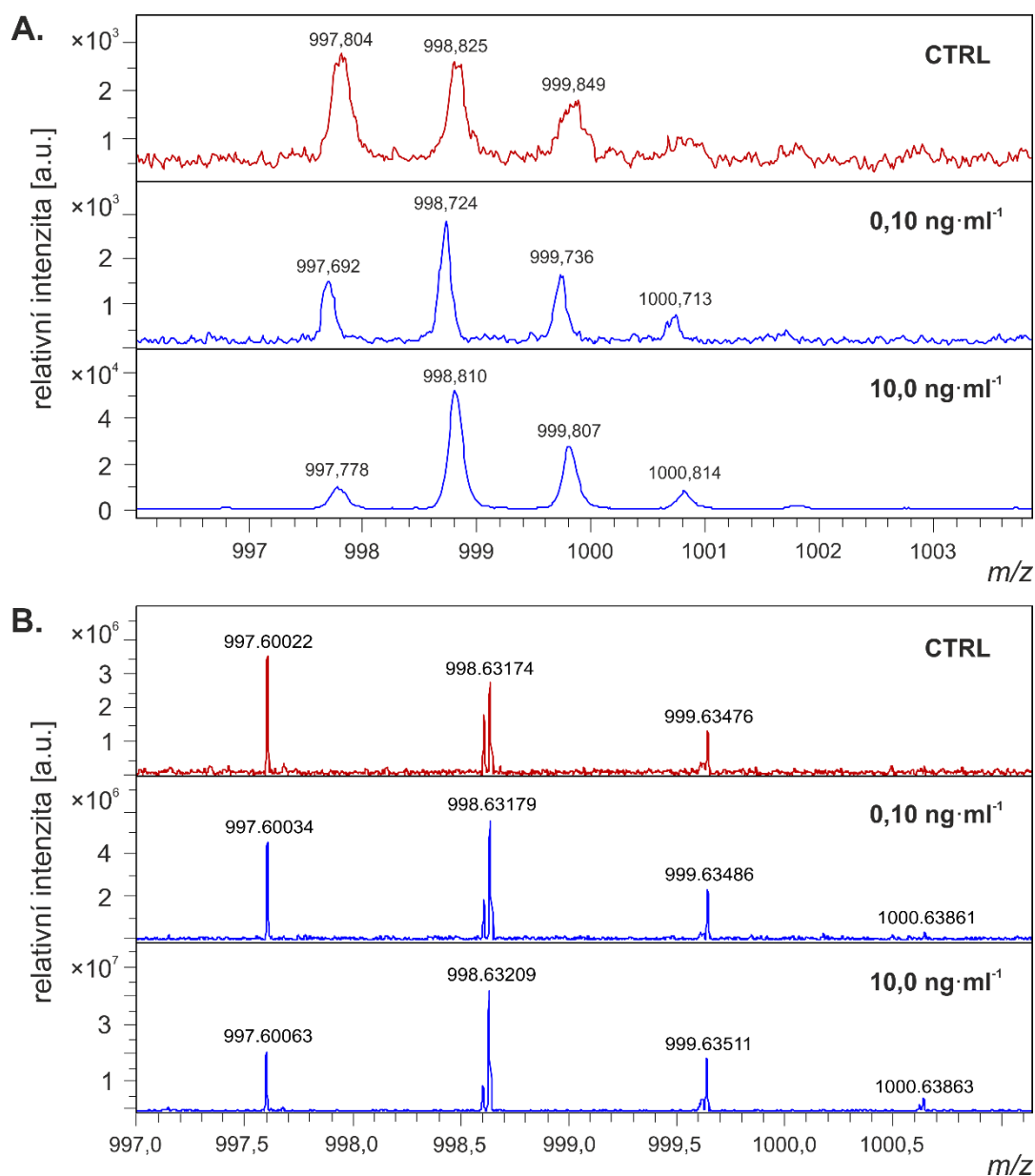
Pro detekci BoNT/A1 v reakčních směsích prostřednictvím protilátek byly k dispozici 4 různé myší monoklonální protilátky označené A1688, CR2, HcA78 a RAZ1, kterými byly modifikovány ITO povrchy. Pro určení limitu detekce pro jednotlivé imobilizované protilátky na nosičích, byly provedeny experimenty tak, že vždy byly na jednom povrchu nanесeny roztoky jak samotného toxinu, tak toxinu v komplexní matici o různých koncentracích. Peptidové produkty BoNT/A aktivity byly měřeny pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie (Obr. 27). Ze získaných dat byl zhotoven graf (Obr. 29, str. 53) závislosti průměrné intenzity signálu C-terminálního (CT) peptidu před a po odečtení průměrné intenzity signálu CTRL na koncentraci toxinu pro jednotlivé protilátky. Tyto údaje jsou zároveň přehledně zapsány v tabulce 3 (str. 54, 55). Na obrázku 28 (str. 52) se nachází spektra CT peptidu pro vybrané reakce se samotným toxinem získaná pomocí MALDI-TOF a MALDI-FT-ICR hmotnostní spektrometrie.



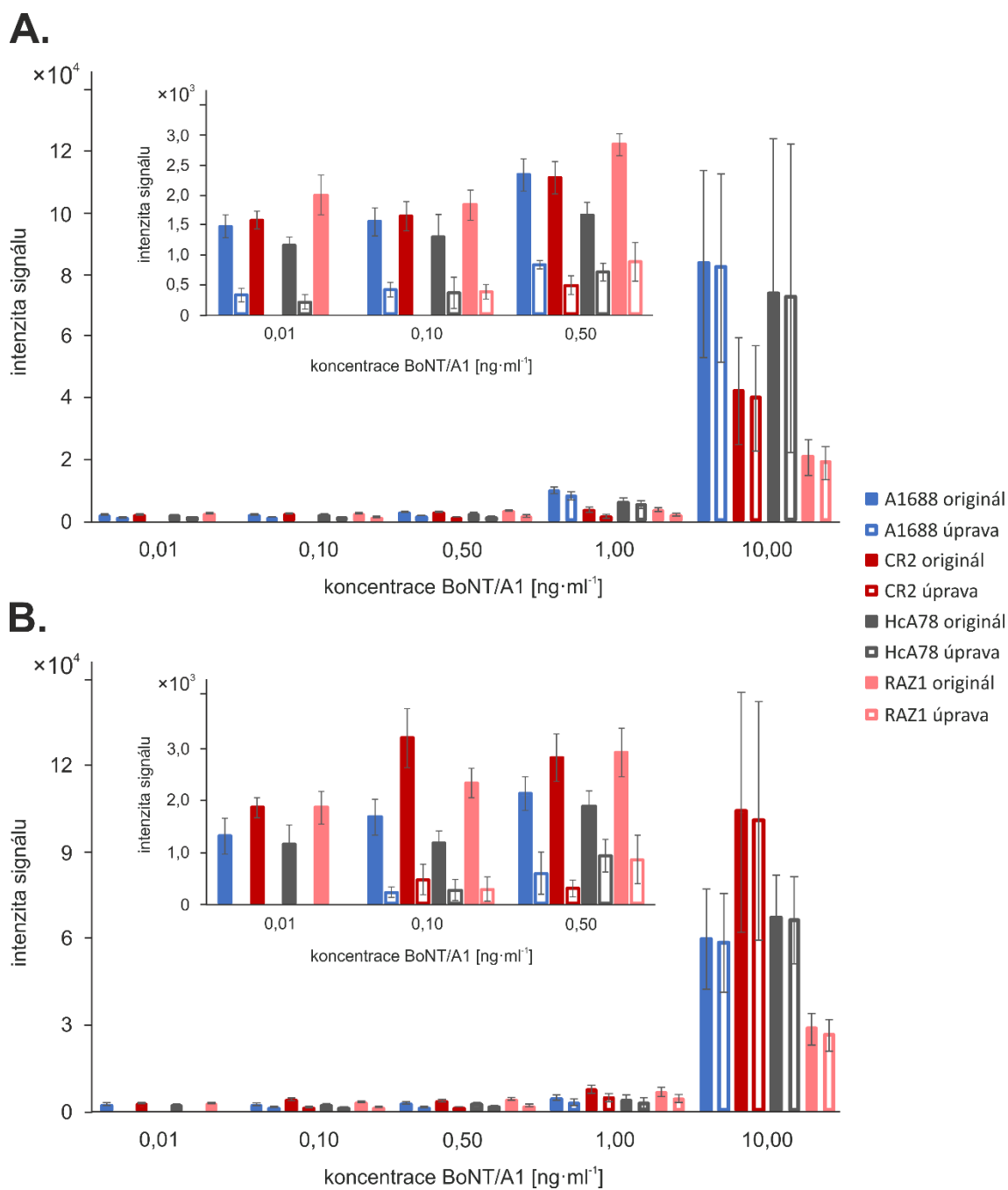




Obr. 27. Porovnání sérií reakčních směsí Pep s toxinem nabohaceným z komplexní matrice nebo roztoku samotného toxinu použitím jednotlivých protilátek – A1688 (1.), CR2 (2.), HcA78 (3.) a RAZ1 (4.). Spektra jsou přibližena na CT (m/z 998,6) (A.) a N-terminální peptid (NT) (m/z 2307,1) (B.); CTRL představuje kontrolní směs. Zeleně je zvýrazněn limit detekce.



Obr. 28. Spektra přibližná na CT peptid získaná pomocí MALDI-TOF-MS (A.) a MALDI-FT-ICR-MS (B.) při koncentraci BoNT/A1 v reakčních směsích se samotným toxinem 0 (CTRL, kontrolní reakční směs); 0,10 a 10,0 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$.



Obr. 29. Grafy závislosti průměrné intenzity signálu CT peptidu na koncentraci toxinu v komplexní matrici (A.) a samotného toxinu (B.) pro povrchy modifikované jednotlivými protilátkami (odlišeny barevně, viz legenda) před a po odečtení signálu sledovaného m/z v kontrolní reakci.

Tab. 3. Tabulka hodnot intenzit CT peptidu pro jednotlivé koncentrace toxinu nabohaceného z reakčních směsí s toxinem nebo toxinem v komplexní matrici pomocí afinitních nosičů modifikovaných jednotlivými anti-BoNT/A1 protilátkami – A1688 (**A.**), CR2 (**B.**), HcA78 (**C.**) a RAZ1 (**D.**). \bar{I} – hodnota průměrné intenzity signálu před (**originál**) a po odečtení průměrného signálu kontrolní reakce (**úprava**), s – směrodatná odchylka a s_r % – relativní směrodatná odchylka vyjádřena v procentech.

A. protilátka A1688		BoNT/A1 v krmivu			čistý BoNT/A1		
c (BoNT/A1)	data	\bar{I}	s	s_r	\bar{I}	s	s_r
$\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$		$\cdot 10^3$	$\cdot 10^3$	%	$\cdot 10^3$	$\cdot 10^3$	%
10,0	originál	83,3	30,2	36	59,3	17,4	29
	úprava	81,8	30,4	37	57,7	17,3	30
1,00	originál	9,25	1,24	13	3,98	1,08	27
	úprava	7,86	1,26	16	2,37	0,99	42
0,50	originál	2,31	0,26	11	2,11	0,33	16
	úprava	0,82	0,07	9	0,56	0,40	71
0,10	originál	1,54	0,24	15	1,66	0,34	21
	úprava	0,40	0,12	29	0,20	0,10	51
0,01	originál	1,46	0,20	14	1,30	0,34	26
	úprava	0,31	0,11	35	-	-	-

B. protilátka CR2		BoNT/A1 v krmivu			čistý BoNT/A1		
c (BoNT/A1)	data	\bar{I}	s	s_r	\bar{I}	s	s_r
$\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$		$\cdot 10^3$	$\cdot 10^3$	%	$\cdot 10^3$	$\cdot 10^3$	%
10,0	originál	42,0	17,3	41	104	41,5	40
	úprava	39,9	17,1	43	101	41,3	41
1,00	originál	3,03	0,68	22	6,93	1,38	20
	úprava	1,00	0,65	65	4,01	1,29	32
0,50	originál	2,27	0,27	12	2,80	0,45	16
	úprava	0,47	0,16	34	0,29	0,16	55
0,10	originál	1,63	0,24	15	3,18	0,57	18
	úprava	-	-	-	0,44	0,30	68
0,01	originál	1,56	0,15	9	1,83	0,20	11
	úprava	-	-	-	-	-	-

C. protilátka HcA78		BoNT/A1 v krmivu			čistý BoNT/A1		
<i>c</i> (BoNT/A1)	data	\bar{I}	<i>s</i>	<i>s_r</i>	\bar{I}	<i>s</i>	<i>s_r</i>
ng·ml ⁻¹		·10 ³	·10 ³	%	·10 ³	·10 ³	%
10,0	originál	73,4	50,3	68	66,8	15,0	22
	úprava	72,3	50,0	69	65,6	15,1	23
1,00	originál	5,51	1,33	24	3,21	1,87	58
	úprava	4,67	1,32	28	2,27	1,82	80
0,50	originál	1,65	0,22	14	1,87	0,30	16
	úprava	0,69	0,15	22	0,92	0,31	33
0,10	originál	1,29	0,37	29	1,16	0,24	20
	úprava	0,35	0,26	73	0,24	0,21	85
0,01	originál	1,15	0,13	11	1,14	0,37	32
	úprava	0,19	0,12	64	-	-	-

D. protilátka RAZ1		BoNT/A1 v krmivu			čistý BoNT/A1		
<i>c</i> (BoNT/A1)	data	\bar{I}	<i>s</i>	<i>s_r</i>	\bar{I}	<i>s</i>	<i>s_r</i>
ng·ml ⁻¹		·10 ³	·10 ³	%	·10 ³	·10 ³	%
10,0	originál	20,7	5,62	27	28,1	5,47	19
	úprava	18,7	5,29	28	25,9	5,52	21
1,00	originál	2,90	0,68	23	5,70	1,47	26
	úprava	1,43	0,50	35	3,45	1,42	41
0,50	originál	2,82	0,18	6	2,89	0,47	16
	úprava	0,87	0,32	37	0,84	0,47	56
0,10	originál	1,82	0,25	14	2,30	0,28	12
	úprava	0,36	0,12	34	0,26	0,24	92
0,01	originál	1,98	0,33	17	1,83	0,32	17
	úprava	-	-	-	-	-	-

5 Diskuse

Botulotoxinům patří díky jejich nízké smrtelné dávce a vysoké účinnosti jedna z prvních příček v řebříčku nejtoxičtějších látek biologického původu. I když jsou kdysi typické otravy těmito neurotoxiny z jídla dnes raritou, rizikové je jejich hojné využití v klinické i estetické medicíně. Kvůli svým toxickým vlastnostem mají také místo v nejvyšší třídě, třídě A, na seznamu činitelů bioterorismu vydávaném Centry pro kontrolu a prevenci onemocnění (Atlanta, USA). Jelikož inkubační doba po intoxikaci se pohybuje v závislosti na dávce mezi 12–72 hodinami [49], pro úspěšnou léčbu je rozhodujícím faktorem časné a správné určení typu botulotoxinu. V dnešní době, kdy jsou ještě pořád nejvíce uznávanou metodou biologické testy na myších [50],[61] narůstá potřeba rychlé, robustní a spolehlivé metody, kterou bychom byly schopni toto stanovení provést v řádu hodin a ne dní, jak je tomu u zmíněných testů.

Tato diplomová práce je výsledkem snahy o spojení metody EndoPep-MS s afinitními nosiči pro detekci BoNT/A, konkrétně subtypu BoNT/A1. Tento typ byl vybrán kvůli skutečnosti, že se jedná o nejčastějšího původce botulismu u lidí a také se nejhojněji využívá ve jmenovaných odvětvích medicíny. EndoPep-MS je metodou pocházející z laboratoře profesora Johna R. Barra (CDC, USA) [50],[61],[68], využívající k detekci aktivního botulotoxinu jeho enzymatickou aktivitu a vznikající peptidové produkty stanovuje pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Afinitní nosiče byly připraveny prostřednictvím měkkého přistávání iontů za atmosférického tlaku na ITO skleněné povrchy. Zkratka ITO představuje vrstvu oxidu indium a cínu na jedné straně těchto povrchů, zabezpečující vodivost důležitou pro kompatibilitu s MALDI hmotnostní spektrometrií. Deponovány byly dva typy látek – biotin-vázající protein neutravidin a myši monoklonální protilátky proti BoNT/A1. Na základě toho byly využity i dva různé substrátové peptidy pro BoNT/A. Oba vycházely z jeho přirozeného cíle v lidském organismu, proteinu SNAP-25. Ten je jedním ze tří proteinů tvořících SNARE komplex v nervosvalových zapojeních, jehož vznik je nevyhnutný při přenosu nervového vzruchu. Pro povrchy funkcionalizované neutravidinem byl určen peptid s navázaným biotinem (*) na C- i N-konci a se sekvencí aminokyselin K*GSNRTRIDQGNQRATRLLGKK*; v této práci označován jako *Pep*. Pro detekci BoNT/A1 s využitím imunoafinitních nosičů byl určen peptid se sekvencí aminokyselin Ac-OOEKAPARGFNKPKIDAGNGR-ATR-Nle-LGGR-NH₂, v kterém Ac představuje acetyl, O 2-naphtylalanin, Nle

norleucin; v této práci označován jako Pep. V tabulce 1 (str. 44) jsou uvedeny sekvence a sledované hodnoty m/z pro tyto peptidy i příslušné peptidové produkty vznikající působením BoNT/A.

Vazba biotinu, kofaktoru sehrávajícího úlohu v několika biologických procesech, jakými jsou buněčný růst nebo citrátový cyklus a biotin-vázajícího proteinu patří mezi nejsilnější známé nekovalentní vazby mezi proteinem a jeho ligandem [85]. Je známo několik biotin-vázajících proteinů, mezi nimi rekombinantní streptavidin z bakterie *Streptomyces avidinii*, avidin z vaječného bílku a jeho deglykosylovaný derivát neutravidin. Vysoká afinita biotinu k těmto proteinům tvoří základ mnohých bioanalytických metod, zejména purifikace proteinů. Z dat získaných v rámci méji bakalářské práce (*Příprava afinitních nosičů pro klinickou diagnostiku, 2019*) zaměřené na výběr optimálního proteinu ze tří výše zmíněných pro modifikaci povrchů s cílem *in situ* nabohacení a detekce jednotlivých peptidů BoNT/A standardu (substrátový peptid (*Pep*), C- a N-terminální produkt (CT* a NT*)), byl pro další experimenty k funkcionalizaci povrchů zvolen biotin-vázající protein neutravidin.

Pro uplatnění každé bioanalytické metody v praxi je důležitá její schopnost stanovit daný analyt v komplexních matricích. Těmi mohou být například vzorky půdy nebo vody, potraviny a různé klinické vzorky – sérum, mozkomíšní mok, stolice. V této práci byl zjišťován limit detekce jednotlivých peptidových produktů aktivity BoNT/A1 v reakčních směsích se samotným toxinem i toxinem v komplexní matrici, pro jejíž přípravu bylo využito suché granulované krmivo pro psy. Při těchto složitých vzorcích představují velkou výhodu zejména afinitní nosiče modifikované anti-BoNT/A1 protilátkami. Ty umožňují vyvázat toxin ještě před inkubací se substrátovým peptidem, čímž jsou odstraněna všechna činidla i nespecifické proteasy, které by se mohly ve vzorku vyskytovat, daný peptid ovlivňovat a poskytovat tak falešně pozitivní či negativní výsledek. Jednou z možností odstranění tohoto problému je zavedení podmínky, kdy pro potvrzení BoNT ve vzorku je nutné detekovat oba vznikající specifické peptidové produkty – C- i N-terminální. Naší metodou jsme byli schopni detekovat NT produkt při použití peptidu *Pep* v reakcích s koncentrací toxinu samotného i v krmivu $1,00 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ a při použití Pep jen v reakcích s nejvyšší připravenou koncentrací toxinu samotného i v krmivu, $10,0 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$. Pro jednotlivé imunoafinitní nosiče jsou tyto výsledky zobrazeny na Obr. 27B (str. 49–51). Tuto skutečnost si vysvětlujeme horší

účinnosti ionizace daného fragmentu. Větší důraz byl proto kladen na detekci CT fragmentu, podle kterého byl posuzován i detekční limit metody.

Jedním z cílů této práce bylo stanovení limitu detekce peptidových produktů s využitím povrchů funkcionalizovaných neutravidinem. Již v mé zmíněné bakalářské práci byl proveden prvotní experiment pro toto stanovení v reakčních směsích s toxinem. Jeho uspořádání bylo dále upravováno společně s uspořádáním experimentů s toxinem v komplexní matici, kvůli zachování stejných podmínek, jelikož tyto reakce sloužily i jako kontrola aktivity toxinu v čase. Limit detekce pro CT* peptid byl stanoven jako koncentrace toxinu $0,01 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ a pro NT* $1,00 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$. Na takto modifikovaných površích byla optimalizována i detekce CT* peptidu v reakčních směsích s BoNT/A1 v komplexní matici. Bylo testováno několik způsobů přípravy této matrice (viz Obr. 18, str. 40) – lišily se velikostí částecek použitého krmiva (nadrčené granuly při experimentech N° 1–4 a rozemleté na jemný prášek při N° 4–5) nebo počtem centrifugačních kroků – i samotných finálních reakčních směsí – inkubace *Pep* s toxinem v krmivu i s jeho částčkami nebo jenom se supernatantem. Přehled spekter napříč těmito změnami je zobrazen na Obr. 23 (str. 45). Jedná se o koncentraci BoNT/A1 $10,0 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ a pro daný postup s komplexním vzorkem je vždy uvedeno i spektrum reakce s čistým toxinem. Jako nejvhodnější postup přípravy byl zvolen N° 4 – přidání toxinu do reakčních směsí s *Pep* i s částčkami krmiva – jelikož intenzita signálu CT* byla téměř při všech koncentracích toxinu srovnatelná s reakcemi se samotným BoNT/A1 (viz Obr. 24, str. 46). Z toho lze usuzovat, že se toxin nejspíše adsorbuje na povrch těchto částecek. Limit detekce pro CT* byl stanoven jako koncentrace BoNT/A1 $0,10 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Posledním provedeným experimentem s využitím neutravidinových nosičů byl validační test, jehož cílem bylo získání statistických údajů jako průměrná intenzita signálu CT*, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka neboli variační koeficient, vyjádřen v procentech. Při validačním testu byla zároveň s pomocí Ing. Petra Halady, Ph.D. (MBÚ, AV ČR) upravena metoda měření MALDI-TOF hmotnostního spektrometru. Jednalo se hlavně o snížení frekvence pulsů laseru z původních 2 000 Hz na 500 Hz. Tato metoda byla dále využívána i při všech experimentech s imunoafinitními nosiči modifikovanými anti-BoNT/A1 protilátkami. Úprava parametrů sice vedla ke zvýšení citlivosti metody, ale odhalila i signál našeho sledovaného fragmentu (m/z 1197,8) v kontrolních reakčních směsích. Podrobnějším zkoumáním spekter byly identifikovány i další peptidové fragmenty, pravděpodobně pocházející ze syntézy tohoto

peptidu. K vyhodnocení získaných dat byl proto zvolen přístup, kdy byla zjištěna průměrná hodnota absolutní intenzity sledovaného fragmentu v kontrole (po odečtení hodnoty šumu), která byla následně odečtena od absolutní intenzity jednotlivých signálů CT* v reakčních směsích s BoNT/A1. Z tabulky 2 (str. 48), kde jsou shrnuty všechny zmíněné údaje – průměrná intenzita původního signálu i signálu po odečtení kontroly, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka pro každou sledovanou koncentraci BoNT/A1 v % – je vidět, že tento postup zpracování dat vedl ve všech případech k ještě vyšším odchylkám. Ty jsou důsledkem hned několika faktorů. První z nich souvisí s přípravou reakčních směsí s toxinem v komplexní matici, protože nelze zajistit, aby v nich bylo pokaždé stejné množství částec krmiva. I samotná MALDI-TOF hmotnostně spektrometrická analýza může zvyšovat chybovost. Za účelem zvýšení citlivosti metody byl kromě standardního 4hodinového reakčního času testován i čas dvojnásobný, 8 hodin, který, jak možno pozorovat ve zmíněné tabulce i na obrázku 25 (str. 47), vedl ke stejné hodnotě detekčního limitu. Ním byla koncentrace BoNT/A1 $0,10 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, při které byla pro čas inkubace 4 hodiny intenzita původního signálu $0,74 \cdot 10^4 \pm 2,10 \cdot 10^3$ (29 %) a intenzita signálu po odečtení kontroly $0,30 \cdot 10^4 \pm 1,89 \cdot 10^3$ (63 %). Také byla v tomto bodě výzkumu přidána koncentrace toxinu $0,50 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$. Jedná se o nejnižší testovanou koncentraci v rámci prvního mezinárodního testu odborné způsobilosti pro detekci a kvantifikaci botulinových neurotoxinů [86], kde byl testován i BoNT/A1, který byl využíván v experimentech v této práci.

Druhá polovina diplomové práce byla zaměřena na detekci aktivního BoNT/A1 pomocí imunoafinitních nosičů modifikovaných jednotlivými anti-BoNT/A1 protilátkami. Byly testovány 4 různé myší monoklonální protilátky – A1688, CR2, HcA78, RAZ1 – bez vlivu na aktivitu toxinu, lišící se doménami rozpoznávání v jeho molekule. Pro protilátky CR2, HcA78 a RAZ1 to jsou epitopy na těžkém řetězci, pro A1688 translokační doména BoNT/A1. Komplexní matrice s toxinem byly připraveny dle postupu optimalizovaného na neutravidinových nosičích a byla zachována koncentrační řada BoNT/A1 i analytická metoda z validačního testu. Přehledy spekter pro jednotlivé protilátky se nacházejí na obrázku 27 (str. 49–51). Jsou přiblížena na CT (Obr. 27A) a NT (Obr. 27B) produkt a vždy jsou mezi sebou srovnávány reakční směsi s toxinem samotným a v komplexní matici (krmivu). Při vyhodnocování dat bylo pozorováno, že signál odpovídající CT peptidu se překrývá s druhým isotopem neznámé látky. Stejný povrch byl proto změřen i MALDI-FT-ICR hmotnostním spektrometrem

pro zjištění přesné hodnoty m/z . Na obrázku 28 (str. 52) jsou zobrazeny vybrané tři reakční směsi s koncentrací BoNT/A1 0; 0,10 a 10,0 ng·ml⁻¹ pro MALDI-TOF (Obr. 28A) i MALDI-FT-ICR (Obr. 28B) hmotnostně spektrometrickou analýzu. Z tohoto porovnání je zřejmé, že se ve vzorku nachází nebo vzniká fragment (m/z 997,60022), který není rozlišen při použití TOF analyzátoru a jeho druhý isotop interferuje se signálem prvního isotopu sledovaného CT peptidu (m/z 998,63174). Další informací, kterou jsme získali z dat s vysokým rozlišením je skutečnost, že i v kontrolní reakci s tímto substrátovým peptidem je určitý podíl fragmentu ze syntézy. Proto byly data vyhodnocena stejným způsobem jako data z validace neutravidinových povrchů a limit detekce CT peptidu byl určen jako koncentrace BoNT/A1, při které jsme po odečtení kontroly měli k dispozici alespoň tři kladné hodnoty ze čtyř měřených. Limitní koncentrace BoNT/A1 byly pro protilátky A1688 a HcA78 shodné pro samotný toxin i toxin v krmivu – 0,10 ng·ml⁻¹ a 0,01 ng·ml⁻¹, pro CR2 byly tyto hodnoty 0,10 ng·ml⁻¹ a 0,50 ng·ml⁻¹ a pro RAZ1 0,50 ng·ml⁻¹ a 0,10 ng·ml⁻¹. Obrázek 29 (str. 53) ukazuje graf závislosti průměrné intenzity signálu původního i po odečtení kontroly pro CT peptid v závislosti na koncentraci toxinu v krmivu (Obr. 29A) nebo samotného (Obr. 29B) a použité protilátce. V tabulce 3 (str. 54, 55) jsou pro dané protilátky uvedeny hodnoty průměrné intenzity signálu, směrodatné odchylky i relativní směrodatné odchylky (vyjádřeno v %) pro data originální i po odečtení kontroly. Stejně jako při validačním testu i tady platí, že odečtením signálu kontroly se dostáváme na vyšší hodnoty odchylek; vysvětlení je shodné pro oba případy.

6 Závěr

Aktivní botulinový neurotoxin, subtyp A1 (BoNT/A1), se podařilo úspěšně detekovat spojením afinitních nosičů a metody EndoPep-MS. Jedná se o metodu využívající endopeptidasovou aktivitu botulotoxinů a vzniklé peptidové produkty jsou identifikovány hmotnostní spektrometrií, obvykle MALDI-TOF-MS. Nosiče byly připraveny metodou měkkého přistávání iontů za atmosférického tlaku, AISL, na skleněné ITO destičky. BoNT/A1 byl stanovován dvěma způsoby v závislosti na příslušné modifikaci povrchů, a to jak ve vzorcích se samotným toxinem, tak toxinem v komplexní matrici. K její přípravě bylo v rámci této práce využito suché granulované krmivo pro psy.

První způsob detekce byl založen na interakci neutravidin-biotin, kdy byly peptidové produkty aktivity toxinu nabohaceny *in situ* na neutravidinem modifikovaný povrch. Limit detekce této metody byl posuzován na základě sledování C-terminálního peptidu. Limitem detekce byla koncentrace BoNT/A1 $0,01 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ pro reakční směsi se samotným toxinem a $0,10 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ pro reakční směsi s toxinem v komplexní matrici.

V druhém případě byly využity imunoafinitní nosiče, funkcionalizovány myšími monoklonálními anti-BoNT/A1 protilátkami. Byly k dispozici celkem čtyři protilátky, A1688, CR2, HcA78, RAZ1, pro které byl určen limit detekce následovně: pro A1688 a HcA78 koncentrace BoNT/A1 $0,01 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ pro reakce se samotným toxinem a $0,10 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ pro reakce s toxinem v komplexní matrici, pro CR2 to byly koncentrace $0,10 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ a $0,50 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ a pro RAZ1 $0,50 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ a $0,10 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Použitá literatura

- [1] A. K. Badu-Tawiah, C. Wu, and R. G. Cooks, "Ambient Ion Soft Landing," *Anal. Chem.*, vol. 83, no. 7, pp. 2648–2654, Apr. 2011, doi: 10.1021/ac102940q.
- [2] A. Tata, C. Salvitti, and F. Pepi, "From vacuum to atmospheric pressure: A review of ambient ion soft landing," *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 450, p. 116309, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.ijms.2020.116309.
- [3] J. Cyriac, T. Pradeep, H. Kang, R. Souda, and R. G. Cooks, "Low-Energy Ionic Collisions at Molecular Solids," *Chem. Rev.*, vol. 112, no. 10, pp. 5356–5411, Oct. 2012, doi: 10.1021/cr200384k.
- [4] B. E. Winger, R. K. Julian, R. G. Cooks, and C. E. D. Chidsey, "Surface reactions and surface-induced dissociation of polyatomic ions at self-assembled organic monolayer surfaces," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 113, no. 23, pp. 8967–8969, Nov. 1991, doi: 10.1021/ja00023a067.
- [5] D. G. Schultz, H. Lim, S. Garbis, and L. Hanley, "Energy partitioning in the surface-induced dissociation of linear and cyclic protonated peptides at an organic surface," *J. Mass Spectrom.*, vol. 34, no. 3, pp. 217–225, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1096-9888(199903)34:3<217::AID-JMS797>3.0.CO;2-R.
- [6] J. Laskin and J. H. Futrell, "Energy transfer in collisions of peptide ions with surfaces," *J. Chem. Phys.*, vol. 119, no. 6, pp. 3413–3420, Aug. 2003, doi: 10.1063/1.1589739.
- [7] D. P. Smith, "Scattering of Low-Energy Noble Gas Ions from Metal Surfaces," *J. Appl. Phys.*, vol. 38, no. 1, pp. 340–347, Jan. 1967, doi: 10.1063/1.1708979.
- [8] P. Hochmann, M. A. Miller, and J. W. Rabalais, "Reactions of diatomic ions with surfaces. 3. Model for interactions of heteronuclear cation beams with elemental surfaces," *J. Phys. Chem.*, vol. 89, no. 13, pp. 2751–2757, Jun. 1985, doi: 10.1021/j100259a010.
- [9] R. D. Beck, J. Rockenberger, P. Weis, and M. M. Kappes, "Fragmentation of C + 60 and higher fullerenes by surface impact," *J. Chem. Phys.*, vol. 104, no. 10, pp. 3638–3650, Mar. 1996, doi: 10.1063/1.471066.
- [10] E. T. Ada, O. Kornienko, and L. Hanley, "Chemical Modification of Polystyrene Surfaces by Low-Energy Polyatomic Ion Beams," *J. Phys. Chem. B*, vol. 102, no. 20, pp. 3959–3966, May 1998, doi: 10.1021/jp9805959.
- [11] B. Gologan, Z. Takáts, J. Alvarez, J. M. Wiseman, N. Talaty, Z. Ouyang, and R. G. Cooks, "Ion soft-landing into liquids: Protein identification, separation, and purification with retention of biological activity," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 15, no. 12, pp. 1874–1884, Dec. 2004, doi: 10.1016/j.jasms.2004.09.005.
- [12] A. Benninghoven and W. Sichtermann, "Secondary ion mass spectrometry: A new analytical technique for biologically important compounds," *Org. Mass Spectrom.*, vol. 12, no. 9, pp. 595–597, Sep. 1977, doi: 10.1002/oms.1210120914.
- [13] H. J. Liebl and R. F. K. Herzog, "Sputtering Ion Source for Solids," *J. Appl. Phys.*, vol. 34, no. 9, pp. 2893–2896, Sep. 1963, doi: 10.1063/1.1729826.
- [14] S. J. Pachuta and R. G. Cooks, "Mechanisms in molecular SIMS," *Chem. Rev.*, vol. 87, no. 3, pp. 647–669, Jun. 1987, doi: 10.1021/cr00079a009.
- [15] R. G. Cooks, T. Ast, and M. A. Mabud, "Collisions of polyatomic ions with surfaces," *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, vol. 100, no. C, pp. 209–265, Oct. 1990, doi:

10.1016/0168-1176(90)85077-F.

- [16] V. Grill, J. Shen, C. Evans, and R. G. Cooks, "Collisions of ions with surfaces at chemically relevant energies: Instrumentation and phenomena," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 72, no. 8, pp. 3149–3179, Aug. 2001, doi: 10.1063/1.1382641.
- [17] M. Vincenti and R. G. Cooks, "Desorption due to charge exchange in low-energy collisions of organofluorine ions at solid surfaces," *Org. Mass Spectrom.*, vol. 23, no. 5, pp. 317–326, May 1988, doi: 10.1002/oms.1210230506.
- [18] M. D. Porter, T. B. Bright, D. L. Allara, and C. E. D. Chidsey, "Spontaneously organized molecular assemblies. 4. Structural characterization of n-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared spectroscopy, and electrochemistry," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 109, no. 12, pp. 3559–3568, Jun. 1987, doi: 10.1021/ja00246a011.
- [19] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, and G. M. Whitesides, "Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology," *Chem. Rev.*, vol. 105, no. 4, pp. 1103–1170, Apr. 2005, doi: 10.1021/cr0300789.
- [20] S. A. Miller, H. Luo, S. J. Pachuta, and R. G. Cooks, "Soft-Landing of Polyatomic Ions at Fluorinated Self-Assembled Monolayer Surfaces," *Science (80-.)*, vol. 275, no. 5305, pp. 1447–1450, Mar. 1997, doi: 10.1126/science.275.5305.1447.
- [21] M. Volný, W. T. Elam, A. Branca, B. D. Ratner, and F. Tureček, "Preparative Soft and Reactive Landing of Multiply Charged Protein Ions on a Plasma-Treated Metal Surface," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 15, pp. 4890–4896, Aug. 2005, doi: 10.1021/ac0507136.
- [22] V. Franchetti, B. H. Solka, W. E. Baitinger, J. W. Amy, and R. G. Cooks, "Soft landing of ions as a means of surface modification," *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, vol. 23, pp. 29–35, 1977.
- [23] H. Chen, L. S. Eberlin, and R. G. Cooks, "Neutral Fragment Mass Spectra via Ambient Thermal Dissociation of Peptide and Protein Ions," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 18, pp. 5880–5886, May 2007, doi: 10.1021/ja067712v.
- [24] A. K. Badu-Tawiah, A. Li, F. P. M. Jjunju, and R. G. Cooks, "Peptide Cross-Linking at Ambient Surfaces by Reactions of Nanosprayed Molecular Cations," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 51, no. 37, pp. 9417–9421, Sep. 2012, doi: 10.1002/anie.201205044.
- [25] P. S. Mayer, F. Tureček, H. N. Lee, A. A. Scheidemann, T. N. Olney, F. Schumacher, P. Štrop, M. Smrčina, M. Pátek, and D. Schirlin, "Preparative Separation of Mixtures by Mass Spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 14, pp. 4378–4384, Jul. 2005, doi: 10.1021/ac050444j.
- [26] G. Siuzdak, T. Hollenbeck, and B. Bothner, "Preparative Mass Spectrometry with Electrospray Ionization," *J. Mass Spectrom.*, vol. 34, pp. 1087–1088, 1999.
- [27] A. L. Yergey and A. K. Yergey, "Preparative scale mass spectrometry: A brief history of the calutron," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 8, no. 9, pp. 943–953, Sep. 1997, doi: 10.1016/S1044-0305(97)00123-2.
- [28] S. Vajda, M. J. Pellin, J. P. Greeley, C. L. Marshall, L. A. Curtiss, G. A. Ballentine, J. W. Elam, S. Catillon-Mucherie, P. C. Redfern, F. Mehmood, and P. Zapol, "Subnanometre platinum clusters as highly active and selective catalysts for the oxidative dehydrogenation of propane," *Nat. Mater.*, vol. 8, no. 3, pp. 213–216, Mar. 2009, doi: 10.1038/nmat2384.
- [29] W. E. Kaden, T. Wu, W. A. Kunkel, and S. L. Anderson, "Electronic structure controls reactivity of size-selected pd clusters adsorbed on tio2 surfaces," *Science (80-.)*, vol. 326, no. 5954, pp. 826–829, Nov. 2009, doi: 10.1126/science.1180297.

- [30] L. Krásný, P. Pompach, M. Strohalm, V. Obsilova, M. Strnadová, P. Novák, and M. Volný, "In-situ enrichment of phosphopeptides on MALDI plates modified by ambient ion landing," *J. Mass Spectrom.*, vol. 47, no. 10, pp. 1294–1302, Oct. 2012, doi: 10.1002/jms.3081.
- [31] P. Pompach, J. Nováková, D. Kavan, O. Benada, V. Ružička, M. Volný, and P. Novák, "Planar functionalized surfaces for direct immunoaffinity desorption/ionization mass spectrometry," *Clin. Chem.*, vol. 62, no. 1, pp. 270–278, 2016, doi: 10.1373/clinchem.2015.244004.
- [32] P. Darebna, J. Spicka, R. Kucera, O. Topolcan, E. Navratilova, V. Ruzicka, M. Volny, P. Novak, and P. Pompach, "Detection and Quantification of Carbohydrate-Deficient Transferrin by MALDI-Compatible Protein Chips Prepared by Ambient Ion Soft Landing," *Clin. Chem.*, vol. 64, no. 9, pp. 1319–1326, Sep. 2018, doi: 10.1373/clinchem.2017.285452.
- [33] P. Pompach, O. Benada, M. Rosůlek, P. Darebná, J. Hausner, V. Růžička, M. Volný, and P. Novák, "Protein Chips Compatible with MALDI Mass Spectrometry Prepared by Ambient Ion Landing," *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 17, pp. 8526–8534, Sep. 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.6b01366.
- [34] R. D. Macfarlane and D. F. Torgerson, "Californium-252 Plasma Desorption Mass Spectroscopy," *Science (80-.)*, vol. 191, no. 4230, pp. 920–925, 1976.
- [35] M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick, and A. N. Tyler, "Fast atom bombardment of solids (F.A.B.): a new ion source for mass spectrometry," *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, no. 7, p. 325, Jan. 1981, doi: 10.1039/c39810000325.
- [36] J. Fenn, M. Mann, C. Meng, S. Wong, and C. Whitehouse, "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules," *Science (80-.)*, vol. 246, no. 4926, pp. 64–71, Oct. 1989, doi: 10.1126/science.2675315.
- [37] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, and T. Yoshida, "Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 2, no. 8, 1988.
- [38] R. C. Beavis, B. T. Chait, and K. G. Standing, "Matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry using 355 nm radiation," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 3, no. 12, pp. 436–439, 1989, doi: 10.1002/rcm.1290031208.
- [39] T. W. Burgoyne and G. M. Hieftje, "An introduction to ion optics for the mass spectrograph," *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 15, no. 4, pp. 241–259, 1996, doi: 10.1002/(SICI)1098-2787(1996)15:4<241::AID-MAS2>3.0.CO;2-I.
- [40] W. C. Wiley and I. H. McLaren, "Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 26, no. 12, pp. 1150–1157, 1955, doi: 10.1063/1.1715212.
- [41] M. B. Comisarow and A. G. Marshall, "Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 25, no. 2, pp. 282–283, Mar. 1974, doi: 10.1016/0009-2614(74)89137-2.
- [42] P. E. Miller and M. B. Denton, "The quadrupole mass filter: Basic operating concepts," *J. Chem. Educ.*, vol. 63, no. 7, p. 617, Jul. 1986, doi: 10.1021/ed063p617.
- [43] M. Karas, U. Bahr, and U. Giebmann, "Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry," *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 10, no. 8, pp. 335–357, 1991.
- [44] K. Strupat, M. Karas, and F. Hillenkamp, "2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry," *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, vol.

- 111, no. C, pp. 89–102, 1991, doi: 10.1016/0168-1176(91)85050-V.
- [45] R. C. Beavis, T. Chaudhary, and B. T. Chait, “ α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrixassisted laser desorption mass spectrometry,” *Org. Mass Spectrom.*, vol. 27, no. 2, pp. 156–158, Feb. 1992, doi: 10.1002/oms.1210270217.
 - [46] R. Patel, “MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases,” *Clin. Chem.*, vol. 61, no. 1, pp. 100–111, 2015, doi: 10.1373/clinchem.2014.221770.
 - [47] B. Mamyurin, V. Karataev, D. Shmikk, and V. Zagulin, “The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution,” *Sov. J. Exp. Theor. Phys.*, vol. 37, no. 1, p. 45, 1973.
 - [48] E. Van Ermengem, “A new anaerobic bacillus and its relation to botulism,” *Rev. Infect. Dis.*, vol. 1, no. 4, pp. 701–719, Jul. 1979, doi: 10.1093/clinids/1.4.701.
 - [49] M. Lindström and H. Korkeala, “Laboratory diagnostics of botulism,” *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 19, no. 2. American Society for Microbiology Journals, pp. 298–314, Apr. 01, 2006, doi: 10.1128/CMR.19.2.298-314.2006.
 - [50] R. J. Hobbs, C. A. Thomas, J. Halliwell, and C. D. Gwenin, “Rapid Detection of Botulinum Neurotoxins—A Review,” *Toxins (Basel)*, vol. 11, no. 7, p. 418, Jul. 2019, doi: 10.3390/toxins11070418.
 - [51] M. B. Dorner, K. M. Schulz, S. Kull, and B. G. Dorner, “Complexity of Botulinum Neurotoxins: Challenges for Detection Technology,” in *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 364, 2012, pp. 219–255.
 - [52] H. Skarin, *Genomic organization and diversity of Clostridium botulinum group III The bug behind animal botulism*. 2015.
 - [53] C. Montecucco and G. Schiavo, “Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins,” *Mol. Microbiol.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–8, Jul. 1994, doi: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00396.x.
 - [54] S. E. Maslanka, C. Lúquez, J. K. Dykes, W. H. Tepp, C. L. Pier, S. Pellett, B. H. Raphael, S. R. Kalb, J. R. Barr, A. Rao, and E. A. Johnson, “A novel botulinum neurotoxin, previously reported as Serotype H, has a hybrid-like structure with regions of similarity to the structures of serotypes A and F and is neutralized with Serotype A antitoxin,” *J. Infect. Dis.*, vol. 213, no. 3, pp. 379–385, 2016, doi: 10.1093/infdis/jiv327.
 - [55] C. Montecucco and G. Schiavo, “Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins,” *Q. Rev. Biophys.*, vol. 28, no. 4, pp. 423–472, Nov. 1995, doi: 10.1017/S0033583500003292.
 - [56] S. Gu, S. Rumpel, J. Zhou, J. Strotmeier, H. Bigalke, K. Perry, C. B. Shoemaker, A. Rummel, and R. Jin, “Botulinum Neurotoxin Is Shielded by NTNHA in an Interlocked Complex,” *Science (80-.)*, vol. 335, no. 6071, pp. 977–981, Feb. 2012, doi: 10.1126/science.1214270.
 - [57] H. Ito, Y. Sagane, K. Miyata, K. Inui, T. Matsuo, R. Horiuchi, T. Ikeda, T. Suzuki, K. Hasegawa, H. Kouguchi, K. Oguma, K. Niwa, T. Ohyama, and T. Watanabe, “HA-33 facilitates transport of the serotype D botulinum toxin across a rat intestinal epithelial cell monolayer,” *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 61, no. 3, pp. 323–331, Apr. 2011, doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00779.x.
 - [58] K. Turton, J. A. Chaddock, and K. R. Acharya, “Botulinum and tetanus neurotoxins : structure , function and therapeutic utility,” *TRENDS Biochem. Sci.*, vol. 27, no. 11, pp. 552–558, 2002.

- [59] I. Ohishi, S. Sugii, and G. Sakaguchi, "Oral Toxicities of Clostridium botulinum Toxins in Response to Molecular Size Downloaded from," 1977. Accessed: Feb. 25, 2021. [Online]. Available: <http://iai.asm.org/>.
- [60] S. Amatsu, Y. Sugawara, T. Matsumura, K. Kitadokoro, and Y. Fujinaga, "Crystal Structure of Clostridium botulinum Whole Hemagglutinin Reveals a Huge Triskelion-shaped Molecular Complex," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 49, pp. 35617–35625, Dec. 2013, doi: 10.1074/jbc.M113.521179.
- [61] J. R. Barr, H. Moura, A. E. Boyer, A. R. Woolfitt, S. R. Kalb, A. Pavlopoulos, L. G. McWilliams, J. G. Schmidt, R. A. Martinez, and D. L. Ashley, "Botulinum Neurotoxin Detection and Differentiation by Mass Spectrometry," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 11, no. 10, pp. 1578–1583, Oct. 2005, doi: 10.3201/eid1110.041279.
- [62] S. S. Arnon, R. Schechter, T. V. Inglesby, D. A. Henderson, J. G. Bartlett, M. S. Ascher, E. Eitzen, A. D. Fine, J. Hauer, M. Layton, S. Lillibridge, M. T. Osterholm, T. O'Toole, G. Parker, T. M. Perl, P. K. Russell, D. L. Swerdlow, and K. Tonat, "Botulinum Toxin as a Biological Weapon," *JAMA*, vol. 285, no. 8, p. 1059, Feb. 2001, doi: 10.1001/jama.285.8.1059.
- [63] A. Dorizas, N. Krueger, and N. S. Sadick, "Aesthetic Uses of the Botulinum Toxin," *Dermatol. Clin.*, vol. 32, no. 1, pp. 23–36, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.det.2013.09.009.
- [64] R. Benecke, "Clinical Relevance of Botulinum Toxin Immunogenicity," *BioDrugs*, vol. 26, no. 2, pp. e1–e9, Apr. 2012, doi: 10.2165/11599840-000000000-00000.
- [65] L. Asensio, I. González, T. García, and R. Martín, "Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)," *Food Control*, vol. 19, no. 1, pp. 1–8, Jan. 2008, doi: 10.1016/j.foodcont.2007.02.010.
- [66] J. L. Ferreira, S. J. Eliasberg, P. Edmonds, and M. A. Harrison, "Comparison of the Mouse Bioassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Procedures for the Detection of Type A Botulinal Toxin in Food," *J. Food Prot.*, vol. 67, no. 1, pp. 203–206, 2004, doi: 10.4315/0362-028X-67.1.203.
- [67] J. L. Ferreira, S. Maslanka, E. Johnson, and M. Goodnough, "Detection of botulinal neurotoxins A, B, E, and F by amplified enzyme-linked immunosorbent assay: Collaborative study," *J. AOAC Int.*, vol. 86, no. 2, pp. 314–331, 2003, doi: 10.1093/jaoac/86.2.314.
- [68] A. E. Boyer, H. Moura, A. R. Woolfitt, S. R. Kalb, L. G. McWilliams, A. Pavlopoulos, J. G. Schmidt, D. L. Ashley, and J. R. Barr, "From the mouse to the mass spectrometer: Detection and differentiation of the endoproteinase activities of botulinum neurotoxins A-G by mass spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 13, pp. 3916–3924, Jul. 2005, doi: 10.1021/ac050485f.
- [69] S. R. Kalb, H. Moura, A. E. Boyer, L. G. McWilliams, J. L. Pirkle, and J. R. Barr, "The use of Endopep-MS for the detection of botulinum toxins A, B, E, and F in serum and stool samples," *Anal. Biochem.*, vol. 351, no. 1, pp. 84–92, Apr. 2006, doi: 10.1016/j.ab.2006.01.027.
- [70] S. R. Kalb, M. C. Goodnough, C. J. Malizio, J. L. Pirkle, and J. R. Barr, "Detection of botulinum neurotoxin A in a spiked milk sample with subtype identification through toxin proteomics," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 19, pp. 6140–6146, Oct. 2005, doi: 10.1021/ac0511748.
- [71] D. Wang, J. Baudys, S. R. Kalb, and J. R. Barr, "Improved detection of botulinum neurotoxin type A in stool by mass spectrometry," *Anal. Biochem.*, vol. 412, no. 1, pp. 67–73, May 2011, doi: 10.1016/j.ab.2011.01.025.

- [72] S. R. Kalb, J. C. Krilich, J. K. Dykes, C. Lúquez, S. E. Maslanka, and J. R. Barr, "Detection of botulinum toxins A, B, E, and F in foods by Endopep-MS," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 63, no. 4, pp. 1133–1141, Feb. 2015, doi: 10.1021/jf505482b.
- [73] S. R. Kalb, J. Lou, C. Garcia-Rodriguez, I. N. Geren, T. J. Smith, H. Moura, J. D. Marks, L. A. Smith, J. L. Pirkle, and J. R. Barr, "Extraction and Inhibition of Enzymatic Activity of Botulinum Neurotoxins/A1, /A2, and /A3 by a Panel of Monoclonal Anti-BoNT/A Antibodies," *PLoS One*, vol. 4, no. 4, p. e5355, Apr. 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0005355.
- [74] S. R. Kalb, C. Garcia-Rodriguez, J. Lou, J. Baudys, T. J. Smith, J. D. Marks, L. A. Smith, J. L. Pirkle, and J. R. Barr, "Extraction of BoNT/A, /B, /E, and /F with a Single, High Affinity Monoclonal Antibody for Detection of Botulinum Neurotoxin by Endopep-MS," *PLoS One*, vol. 5, no. 8, p. e12237, Aug. 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0012237.
- [75] O. Rosen, L. Feldberg, E. Dor, S. Gura, and R. Zichel, "Optimization of SNAP-25-derived peptide substrate for improved detection of botulinum A in the Endopep-MS assay," *Anal. Biochem.*, vol. 528, pp. 34–37, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.ab.2017.04.012.
- [76] D. Wang, J. Krilich, J. Baudys, J. R. Barr, and S. R. Kalb, "Enhanced detection of type C botulinum neurotoxin by the Endopep-MS assay through optimization of peptide substrates," *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 23, no. 13, pp. 3667–3673, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.bmc.2015.04.012.
- [77] D. Wang, J. Baudys, K. M. Hoyt, J. R. Barr, and S. R. Kalb, "Further optimization of peptide substrate enhanced assay performance for BoNT/A detection by MALDI-TOF mass spectrometry," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 409, no. 20, pp. 4779–4786, Aug. 2017, doi: 10.1007/s00216-017-0421-8.
- [78] D. Wang, J. Baudys, Y. Ye, J. C. Rees, J. R. Barr, J. L. Pirkle, and S. R. Kalb, "Improved detection of botulinum neurotoxin serotype A by Endopep-MS through peptide substrate modification," *Anal. Biochem.*, vol. 432, no. 2, pp. 115–123, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.ab.2012.09.021.
- [79] F. Gessler, S. Pagel-Wieder, M. A. Avondet, and H. Böhnelt, "Evaluation of lateral flow assays for the detection of botulinum neurotoxin type A and their application in laboratory diagnosis of botulism," *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 57, no. 3, pp. 243–249, Mar. 2007, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2006.07.017.
- [80] J. Liu, S. Gao, L. Kang, B. Ji, W. Xin, J. Kang, P. Li, J. Gao, H. Wang, J. Wang, and H. Yang, "An Ultrasensitive Gold Nanoparticle-based Lateral Flow Test for the Detection of Active Botulinum Neurotoxin Type A," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 12, no. 1, p. 227, Dec. 2017, doi: 10.1186/s11671-017-1944-9.
- [81] P. Čapek and T. Dickerson, "Sensing the Deadliest Toxin: Technologies for Botulinum Neurotoxin Detection," *Toxins (Basel)*, vol. 2, no. 1, pp. 24–53, Jan. 2010, doi: 10.3390/toxins2010024.
- [82] A. K. Singh, L. H. Stanker, and S. K. Sharma, "Botulinum neurotoxin: Where are we with detection technologies?," *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 39, no. 1, pp. 43–56, 2013, doi: 10.3109/1040841X.2012.691457.
- [83] M. Wictome, K. A. Newton, K. Jameson, P. Dunnigan, S. Clarke, J. Gaze, A. Tauk, K. A. Foster, and C. C. Shone, "Development of in vitro assays for the detection of botulinum toxins in foods," *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 24, no. 3, pp. 319–323, Jul. 1999, doi: 10.1111/j.1574-695X.1999.tb01300.x.
- [84] A. D. Hitchins, K. Jinneman, and Y. Chen, "Bacteriological analytical manual," *Food*

Drug Adm. Washington, DC, 1998.

- [85] Y. Lindqvist and G. Schneider, "Protein-biotin interactions," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 6, no. 6, pp. 798–803, Dec. 1996, doi: 10.1016/S0959-440X(96)80010-8.
- [86] S. Worbs, U. Fiebig, R. Zeleny, H. Schimmel, A. Rummel, W. Luginbühl, and B. Dörner, "Qualitative and Quantitative Detection of Botulinum Neurotoxins from Complex Matrices: Results of the First International Proficiency Test," *Toxins (Basel)*, vol. 7, no. 12, pp. 4935–4966, Nov. 2015, doi: 10.3390/toxins7124857.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím o řádné vedení evidence.

Jméno a příjmení	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka